

团 体 标 准

T/CI 160—2022

极端环境真菌的分离、培养、保藏和应用技术指南

Technical guidelines for isolation, culture, preservation and application of extreme environmental fungi

2022 - 12 - 15 发布

2022 - 12 - 15 实施

中国国际科技促进会 发 布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	2
5 试剂和材料	2
6 耗材与仪器	3
7 样品采集、现场处理及资料整理	3
8 极端真菌的分离、培养、纯化	4
9 极端真菌生长温度的确定（无菌操作）	6
10 嗜盐真菌抗盐性的确定（无菌操作）	6
11 极端真菌降解毒素、钝化重金属的指标及检测方法	6
12 极端真菌全基因组 DNA 的提取	7
13 极端真菌 18s rDNA 基因片段的扩增	7
14 极端真菌的分子鉴定	7
15 极端真菌样品及种质资源保藏	8
附录 A（资料性） 极端环境真菌样品采集、鉴定、保藏记录表格式	10
附录 B（资料性） 极端环境真菌的分子鉴定	12
参考文献	13

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国国际科技促进会提出并归口。

本文件起草单位：沈阳农业大学、辽宁伊品九利农业科技发展有限公司、沈阳汉明种业有限公司、东北农业大学、吉林大学、沈阳市食品药品检验所、沈阳九利肥业股份有限公司、黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所、香港中文大学。

本文件主要起草人：张世宏、魏 毅、于术军、刘庆玉、李凤兰、李桂华、耿丽娟、李柱刚、林汉明。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及3.1、3.4、5.4、5.12、5.17、5.18、7.1、7.2.1、7.2.2a)、7.3、7.4、8.1、8.2.1、8.3、9.3、10、12、13、14、15中相应内容的专利《一种抗盐耐碱的曲霉菌株、其ITS序列及应用ZL 2018 1 0855005.0》、《一种源于极端抗盐碱曲霉的纤维素酶基因及应用ZL 2016 1 0005024.5》、《一株抗盐碱赭曲霉菌株W1及其菌剂和应用ZL 2019 1 0659129.6》、《耐碱嗜盐类型的灰绿曲霉菌株及其在环境治理中的应用 ZL 2013 1 0162347.1》的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在公平、合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。

表1中列出的专利权人持有本文件涉及的专利。

表1 持有本文件涉及的专利的专利权人相关信息

专利持有人	地址
史洋	北京市朝阳区广渠路36号首城国际B区11号楼1单元2202
吉林大学	吉林省长春市前进大街2699号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

极端环境真菌的分离、培养、保藏和应用技术指南

1 范围

本文件提供了极端环境真菌（以下简称“极端真菌”）的来源，分离、培养、鉴定、保藏方法和生物技术应用指南。

本文件适用于极端真菌的分离、培养、鉴定、保藏与应用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

GB 13078-2017 饲料卫生标准

GB 15618-2018 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准（试行）

GB 36600-2018 土壤环境质量 建设用地土壤污染风险管控标准（试行）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

极端环境真菌 *extreme environmental fungi*

在常见普通真菌无法生存的极端环境条件下（如高温低温、高盐、高毒素、缺水、脱水、低氧厌氧、高压强等）能够正常生长、发育、繁殖的真菌。

注：常见的普通真菌一般生长在温度22℃~36℃，湿度95%~100%，pH5~6.5的有氧环境。普通真菌对高/低温度、高渗透（高盐与脱水）、高毒素、低氧或厌氧、高压强等敏感、适应性差。

3.2

嗜冷真菌 *psychrophilic fungi*

最适生长温度小于等于15℃、最高生长温度小于等于25℃的真菌。

3.3

嗜热真菌 *thermophilic fungi*

最适生长温度大于等于40℃、最低生长温度大于等于20℃的真菌。

3.4

嗜盐真菌 *halophilic fungi*

在大于等于5%钠、钾等常规盐离子浓度环境生长最快的真菌。

3.5

毒素降解真菌 *toxin-degrading fungi*

适宜于在毒素环境生存，具有将呕吐毒素（DON）、黄曲霉毒素（AFT）、玉米赤霉烯酮（ZEN）等毒素降解为低毒或者无毒物质的真菌。

3.6

钝化重金属真菌 *passivate heavy metal fungi*

适宜于在重金属污染环境生存，具有钝化重金属，使其缓慢氧化或化合，减少离子状态，从而缓解作物吸收的真菌。

3.7

重金属 *heavy metal*

密度大于4.5g/cm³的金属。

注：在环境污染方面，重金属主要是指汞（水银）、镉、铅、铬以及类金属砷等生物毒性显著的重元素。重金属非常难以被生物降解，相反却能在食物链的生物放大作用下，成千百倍地富集，最后进入人体。重金属在人体内

能和蛋白质及酶等发生强烈的相互作用，使它们失去活性，也可能在人体的某些器官中累积，造成慢性中毒。2018年我国颁布的《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准（试行）GB 15618-2018》和《土壤环境质量建设用地土壤污染风险管控标准（试行）GB 36600-2018》规定了土壤环境重金属污染上限指标，超过此指标即存在影响人类健康的危害，需要及时的修复和风控。砷在第一类土地中不能超过120 mg/kg，第二类土地中不能超过140 mg/kg。镉在第一类土地中不能超过47 mg/kg，在第二类土地中不能超过172 mg/kg。铬在第一类土地中不能超过30 mg/kg，在第二类土地中不能超过78 mg/kg。铅在第一类土地中不能超过800 mg/kg，在第二类土地中不能超过2500 mg/kg。汞在第一类土地中不能超过33 mg/kg，在第二类土地中不能超过82 mg/kg。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AFT (AFB、AFG、AFM)：黄曲霉毒素 (Aflatoxin)

bp：碱基对 (base pair)

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵 (Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide)

DON：脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol)，又称呕吐毒素 (vomitoxin)

EDTA：乙二胺四乙酸 (Edetate Disodium)

MIC：重金属最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration)

PCR：聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

PDA：马铃薯葡萄糖培养基 (Potato Dextrose Agar)

PBS：磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

NaCl：氯化钠化学式 (Sodium chloride)

Str：硫酸链霉素 (Streptomycin sulfate)

ZEN：玉米赤霉烯酮 (Zearalenone)

18s rDNA：真核生物染色体上编码核糖体RNA18S亚基的基因

5 试剂和材料

5.1 除另有规定外，试剂为分析纯和蒸馏水。

5.2 DNA 胶回收试剂盒、各种毒素 ELISA 检测试剂盒、毒素荧光定量快速检测测试纸条。

5.3 2xTaq PCR StarMix：pcr 预混液。

5.4 极端真菌鉴定引物对 ITS1 和 ITS4。

5.5 50×TAE 电泳缓冲液：称取 242.0g Tris-base、37.2g EDTA-Na₂·2H₂O、57.1mL 冰醋酸，溶解于适量蒸馏水中，用 10M NaOH 溶液调节 pH=8.3，补充水分定容至 1000mL，室温保存。使用时需将 50×TAE 稀释为 1×TAE。

5.6 30%无菌甘油：水：甘油=7:3，121℃灭菌 15min。

5.7 CTAB 溶液：称取 20g CTAB、29.2g EDTA-Na₂·2H₂O、1M Tris-HCl 100mL (pH=8.0)、5M NaCl 280mL，溶解于适量蒸馏水中，补充水分定容至 1000mL，1%的 β-巯基乙醇（现用现配），室温保存。

5.8 氯仿异戊醇混合液：氯仿：异戊醇体积比为 24:1，在通风橱中，将异戊醇加入到氯仿中混合均匀即可。

5.9 10M NaOH 溶液：称取 400g NaOH，溶解于适量蒸馏水中，补充水分定容至 1000mL，配制成 10M 的 NaOH 溶液。

5.10 PBS 磷酸盐缓冲液：称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄，溶解于适量蒸馏水中。用盐酸调节 pH=7.4，补充水分定容到 1000mL，用 0.22um 的微孔滤膜抽滤灭菌。4℃保存。

5.11 琼脂糖凝胶：称取 10g 琼脂糖，缓慢加入 1×TAE 缓冲液，加热使之充分溶解，配制成 10g/L 的琼脂糖凝胶。

5.12 PDA 培养基，按以下步骤制备：

a) 称取 200g 去皮马铃薯，切成小块，加适量水煮沸 20min~30min（能被玻璃棒戳破即可），用八层纱布过滤；

b) 在过滤液加入 18g 琼脂粉，继续加热搅拌混匀，待琼脂粉溶解完后，加入 20g 葡萄糖，搅拌均匀，稍冷却后再补足水分至 1000mL，分装玻璃试管或者锥形瓶，用封口膜封口，121℃灭菌 15min。液体培养基 PDB 不加琼脂粉；

- c) PDA 斜面培养基: 分装量为玻璃试管高度的 1/4 (4mL ~5mL), 灭菌后趁热摆放斜面, 制成斜面培养基, 倾斜度为试管中的培养基约占试管长度的 1/2。
- 5.13 降解 DON 筛选培养基: 称取 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3 g KH_2PO_4 、6g K_2HPO_4 、0.5g NaCl 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05g CaCl_2 、0.001g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05g 蛋白胨、20g 琼脂粉, 溶解于适量蒸馏水中, 用盐酸调节 pH=6.0~7.0, 补充水分定容至 1000mL, 121℃灭菌 15min。灭菌后, 待冷却至 50℃~60℃时, 在无菌操作台里加入抽滤除菌的氧化苯乙烯, 终浓度为 15mmol/L, 趁热倒入培养皿, 待培养基凝固即制成脱氧雪腐镰刀菌烯醇筛选培养基平板, 置于无菌操作台备用。液体培养基不加琼脂粉。
- 注: 氧化苯乙烯是脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (呕吐毒素) 类似物, 可替代 DON 进行初步筛选高效降解 DON 毒素真菌。
- 5.14 降解 AFT 筛选培养基: 称取 5.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5 g KH_2PO_4 、1.0g MgSO_4 、0.5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g CaCl_2 、20g 琼脂粉, 溶解于适量蒸馏水中, 用盐酸调节 pH=6.5, 补充水分定容至 1000mL, 121℃灭菌 15min。灭菌后, 待冷却至 50℃~60℃时, 在无菌操作台里加入抽滤除菌的香豆素溶液, 终浓度为 1g/L, 趁热倒入培养皿, 待培养基凝固即制成黄曲霉毒素筛选培养基平板, 置于无菌操作台备用。液体培养基不加琼脂粉。
- 注: 香豆素是黄曲霉毒素 (AFT) 类似物, 可替代 AFT 进行初步筛选高效降解 AFT 毒素真菌。
- 5.15 降解 ZEN 筛选培养基: 称取 2.0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5g NaH_2PO_4 、0.5g K_2HPO_4 、0.2g MgSO_4 、0.1g CaCl_2 、20g 琼脂粉, 溶解于适量蒸馏水中, 用盐酸调节 pH=7.0, 补充水分定容至 1000mL, 121℃灭菌 15min。灭菌后, 待冷却至 50℃~60℃时, 在无菌操作台里加入抽滤除菌的赤霉烯酮溶液, 终浓度为 1g/L, 趁热倒入培养皿, 待培养基凝固即制成玉米赤霉烯酮毒素筛选培养基平板, 置于无菌操作台备用。液体培养基不加琼脂粉。
- 5.16 含有重金属的 PDA 培养基制备: PDA 培养基配方同 5.12, 调节 pH=5.0 (防止重金属沉淀), 121℃灭菌 15min。灭菌后, 待冷却至 50℃~60℃时, 在无菌操作台里加入过滤除菌的重金属溶液, 趁热倒入培养皿, 待培养基凝固即制成重金属 PDA 培养基, 置于无菌操作台备用。液体培养基不加琼脂粉。
- 5.17 含有 NaCl 的 PDA 培养基: PDA 培养基配方同 5.12, pH 值自然, 加入 NaCl 制成不同质量分数 (%) 的 NaCl PDA 培养基。液体培养基不加琼脂粉。
- 5.18 琼脂粉培养基: 称取琼脂粉 18g, 溶解于适量蒸馏水中, 补充水分定容至 1000mL, 121℃灭菌 15min。
- 5.19 培养基的无菌检测: 将灭菌后的培养基放在 28℃~34℃培养箱中, 培养 1~3 天, 检查合格后将其保存于 4℃或者室温。

6 耗材与仪器

- 6.1 玻璃培养皿: 规格为 60mm、90mm、150mm。
- 6.2 微孔滤膜: 材质为聚醚砜, 直径 13mm, 孔径包括 0.22μm、0.45μm。
- 6.3 小型离心管: 材质为聚丙烯的离心管, 规格为 0.2mL、0.5mL、1.5mL、2.0mL、5mL、50mL。
- 6.4 枪头: 材质为聚丙烯的移液器套头, 规格为 10μL、200μL、1000μL。
- 6.5 玻璃试管: 18mm×180mm 的平口玻璃试管。
- 6.6 移液器: 规格为 10μL、20μL、50μL、100μL、200μL、1000μL。
- 6.7 生化培养箱: 箱内温度可在 0℃~80℃范围内调节。
- 6.8 振荡培养箱: 箱内温度可在 0℃~80℃范围内调节, 转速可在 0rpm~300rpm 范围内调节。
- 6.9 超低温冰箱: 箱内最低温度为 -80℃。
- 6.10 小型高速冷冻离心机: 温度可在 0℃~40℃范围内调节, 离心管使用规格为 1.5mL、2.0mL, 转速可在 0rpm~13000rpm 范围内调节。
- 6.11 电泳仪: 最大输出电压为 250 V 以上, 最大输出电流为 300mA 以上。
- 6.12 超微量分光光度计。
- 6.13 超声波细胞破碎仪。
- 6.14 高效液相色谱仪 (HPLC)。
- 6.15 真菌/霉菌毒素荧光定量快速检测仪。
- 6.16 其他生物学实验常规仪器: PCR 仪, 无菌操作台、金属浴、电子天平、高压灭菌锅、漩涡振荡器、普通家用冰箱、显微镜、液氮罐、硅胶塞、涂布棒、酒精灯、剪刀、纱布、镊子、无菌采样瓶。

7 样品采集、现场处理及资料整理

7.1 样品来源

不同极端环境、不同地区的土壤（污泥/沉积物、盐碱土、有色金属矿区、重金属污染地区、植物根际、热泉、火山口、常年寒冷或冰冻地带、干旱地带、阴暗地带、玉米及小麦等作物种植区、塑胶跑道、背阴处、树林、霉菌污染的土壤）、不同极端环境的水样品；发霉粮食及饲料、发酵食品、腐烂朽木、堆积生物质；散养与圈养的不同年龄段、不同品种、不同地区的牛、羊、鸡等畜禽动物新鲜粪便。

7.2 样品采集

7.2.1 采集要求

所采集的样品具有代表性，按照样品所在的极端环境不同而采取不同的现场处理方式，并及时记录采集时间、地点、样品名称等相关参数（参见表A.1）。

7.2.2 土壤样品的采集

土壤样品的采集宜注意以下事项：

- a) 面积比较大的地块：采用多点采集（一般为 5 个），再混合为一个样品的方法。一般都是随机采集，可以采用梅花点法、棋盘式法和蛇形法等。根据实验目的，采集不同深度的土壤，一般表层土取 0cm~5cm 或 0cm~10cm，可以用铁铲和小铲子配合完成；如果土壤样本较深，可以采用土钻和小铲子进行采集；
- b) 根际土的采集：根际土一般是指附着在根系表面的土壤。在采集根际土时首先采集包含植物根系的土壤，对于质地松散的土壤，采用抖土法抖掉与根系松散结合的土壤，采用小刷将与根系紧密结合的土壤刷下来，作为根际土；
- c) 淤泥/沉积物的采集：采集刮去表层 3cm 的淤泥/沉积物。采集河滩、海滩等样本，可以利用小铲子完成；采集河底、海底等特殊地段的样本，采用专业的采样设备如采泥器来完成样本采集。

7.2.3 水样品的采集

污水、海水等极端环境水源。水表面5cm以下水。

7.2.4 发霉粮食与饲料的采集

去除发霉粮食堆、饲料垛表层3cm，然后分层随机采集，一般份三层，再混合为一个样品。

7.2.5 采集牛、羊、鸡等畜禽的新鲜粪便

散养与圈养的不同年龄段、不同品种、不同地区的牛、羊、鸡等畜禽的新鲜粪便。

7.3 样品现场处理

根据不同目的，不同的样品采集后分别进行现场处理。盛有新鲜土壤、淤泥/沉积物样品的无菌瓶放入冰盒（泡沫盒+冰袋/干冰）或保温瓶中进行保存，新鲜牛、羊、鸡等畜禽的新鲜粪便放入保温瓶中保存，发霉粮食及饲料、发酵食品等放入无菌瓶，室温保存。到实验室后尽快分离。或者暂时在4℃冰箱、室温、50℃培养箱保存。

7.4 资料整理

将采集时间、地点、采样站位的经纬度、温度、盐度、样品名称、现场处理方式、保存方式等相关参数记录于极端环境真菌样品采集记录表（参见表A.1）。

8 极端真菌的分离、培养、纯化

8.1 分离总则

8.1.1 从不同极端环境所采集的土壤、淤泥/沉积物、水样品、发霉粮食及饲料、发酵食品、腐烂朽木；散养与圈养的牛、羊、鸡等畜禽新鲜粪便中分离真菌菌株，包括嗜冷真菌菌株、嗜热真菌菌株、嗜盐真菌菌株、高效降解毒素真菌菌株及钝化重金属真菌菌株。

8.1.2 菌株分离的基本内容包括：富集培养、样品稀释、涂布于固体培养基、挑取单菌落、复筛、纯化。

8.1.3 分离菌株时选用保存在 4℃ 冰箱、室温、50℃ 培养箱的样品，或者用刚采集的样品进行现场分离。

8.1.4 分离菌株时根据分离目的不同选用相应的培养基。

8.1.5 所有的操作均在无菌的条件下进行。

8.2 基本操作

8.2.1 土壤及淤泥/沉积物样品中极端真菌的分离

分离步骤如下：

- 称取土壤及淤泥/沉积物 10g，放入盛有 90mL 无菌蒸馏水带有玻璃珠的三角瓶中，震荡 5min~10min，使土样充分溶解，静置 30sec，即得土壤原液（ 10^{-1} ）。在无菌操作台中用移液器吸取 1mL 悬浮液，加入盛有 9mL 无菌蒸馏水的试管中，充分混匀，制成 10^{-2} 样品稀释液；
- 在无菌条件下用移液器吸取 1mL 8.2.1 a) 所制溶液，加入另一盛有 9mL 无菌蒸馏水的试管中，充分混匀，制成 10^{-3} 样品稀释液，以此类推分别制成 10^{-4} ~ 10^{-7} 样品稀释液；
- 吸取 200 μ L 各梯度样品稀释液均匀涂布于含有硫酸链霉素（抑制细菌生长，终浓度为 50 μ g/mL）的相应固体培养基平板中，敞开盖室温放置 10min，使稀释液充分溶于培养基中，然后倒置、黑暗培养。嗜冷真菌培养温度为 4℃~10℃，嗜热真菌培养温度为 50℃，嗜盐真菌及降解毒素真菌、钝化重金属真菌培养温度为 25℃。每个稀释浓度设置三个平行处理；
- 培养 2~3 天后开始每天观察菌株生长情况，挑取不同形态的单菌落，移接到新的 PDA 培养基上继续培养，以备后续操作。

8.2.2 腐烂朽木样品中极端真菌的分离

将剪碎的朽木浸泡于无菌蒸馏水，充分振荡，制成菌悬液，按 8.2.1 的方法进行分离，涂布于相应的固体培养基上进行培养。嗜冷真菌培养温度为 4℃~10℃，嗜热真菌培养温度为 50℃，降解毒素真菌培养温度为 25℃。

8.2.3 牛、羊、鸡等畜禽新鲜粪便样品中嗜热真菌的分离

取适量新鲜的牛、羊、鸡粪便平铺在 150mm 培养皿中，在表面放置一张与培养皿大小一致的薄纸，均匀喷洒 1% 蔗糖溶液将纸润湿，盖好皿盖，在 50℃ 恒温培养，培养期间定期喷洒 1% 蔗糖溶液，以保持湿润的环境。待薄纸上长出菌落，立即挑取单菌落移接到新的 PDA 培养基上，在 55℃ 继续培养。

8.2.4 样品中高效降解毒素真菌的富集培养分离

富集培养分离采用以下步骤：

- 称取适量土壤、发霉粮食及饲料、发酵食品的副产物、剪碎的朽木等样品，加入适量无菌蒸馏水中，25℃ 充分振荡 1 小时，得到悬浊液；
- 取悬浊液以 10% 接种量接种于 PDB 中，25℃ 振荡培养 24hr 得到富集液。在无菌操作台中吸取富集液，以 10% 接种量分别接种至含有不同毒素（DON、ZEN、AFT）的筛选液体培养基，25℃、160rpm 摇床培养 5d；
- 培养 5d 后分别吸取 8.2.4 b) 中的富集液，以 10% 接种量进行下一次转接，并逐步梯度提高筛选液体培养基中毒素的浓度（DON 浓度 15mmol/L、20mmol/L、25mmol/L；ZEN 浓度为 10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL 和 40mg/mL；AFT 浓度为 1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3.0mg/mL、3.5mg/mL）；
- 分别吸取 8.2.4 c) 中最后一次培养的富集液，用无菌 PBS 磷酸盐缓冲液进行梯度稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ；吸取稀释液 200 μ L 分别涂布于相应的以 DON、ZEN 和 AFT 毒素为唯一碳源的筛选固体培养基上，每个稀释浓度设置三个平行处理，25℃，倒置，黑暗培养。
- 培养 2~3 天后开始每天观察菌株生长情况，挑取不同形态的单菌落，移接到新的 PDA 培养基上继续培养，以备后续操作。

8.2.5 水样品的分离

去除水样品的杂质，制成水样品原液，按8.2.1的方法进行分离，涂布于相应的固体培养基上进行培养。嗜冷真菌培养温度为4℃~10℃，嗜热真菌培养温度为50℃，降解毒素真菌和嗜盐真菌培养温度为25℃。

8.3 极端真菌菌株的纯化

8.3.1 连续移菌纯化法

待8.2中培养的单菌落直径生长至4cm~5cm，在菌落边缘挑取少量菌丝移接到新的PDA培养基上，以此类推，直至菌株菌落形态观察完全一致，则可认为是纯菌株。

8.3.2 单孢纯化法

为进一步确定纯菌株，可将8.3.1的纯菌株进行培养产孢，制成浓度为 1×10^4 的孢子悬浮液，吸取100μL涂布到琼脂粉培养基上，培养12hr以后观察，发现单菌落长出，立即移接到新的PDA培养基上继续培养，如无杂菌生长，则可认定为纯菌株。

9 极端真菌生长温度的确定（无菌操作）

9.1 嗜冷真菌生长温度的确定

9.1.1 在PDA培养基中活化在8.3中获得的嗜冷纯菌株，待菌株生长至培养皿的1/3至1/2时，在菌落边缘取直径为5mm的菌丝块，移接到新的PDA培养基中央位置进行培养，菌丝面朝下。

9.1.2 在0℃~25℃的范围内进行培养，温度设置为0℃、5℃、10℃、15℃、20℃和25℃，每个温度设置三个平行处理。

9.1.3 从菌株生长开始，每隔24hr测量一次菌株直径，直至菌株生长的第七天。采取十字交叉法进行测量，每个处理测量多组十字交叉，最后取三个处理的平均值。

9.1.4 根据测量结果确定嗜冷菌株的生长温度范围和最适生长温度。

9.2 嗜热真菌生长温度的确定

在40℃~65℃的范围内进行培养，温度设置为40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃，每个温度设置三个平行处理。其他操作按照9.1方法进行。根据测量结果确定嗜热菌株的生长温度范围和最适生长温度。

9.3 嗜盐真菌和高效降解毒素真菌、钝化重金属真菌生长温度的确定

嗜盐真菌在含有5%NaCl的PDA培养基中培养，高效降解毒素、钝化重金属真菌在普通的PDA培养基中培养。在20℃~50℃的范围内进行培养，温度设置为20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃，每个温度设置三个平行处理。其他操作按照9.1方法进行。根据测量结果确定嗜盐真菌和高效降解毒素真菌、钝化重金属真菌的生长温度范围和最适生长温度。

10 嗜盐真菌抗盐性的确定（无菌操作）

10.1 在PDA培养基中活化在8.3中获得的嗜盐纯菌株，待菌株生长至培养皿的1/3至1/2时，在菌落边缘取直径为5mm的菌丝块，移接到含有不同浓度NaCl的PDA培养基中央位置进行培养，菌丝面朝下。

10.2 PDA培养基中NaCl的含量分别为0%，5%，10%，15%，20%，25%，30%，每个盐度设置三个平行处理。

10.3 培养温度为9.3中所确定的最适生长温度，测量方法按照9.1进行。

10.4 根据测量结果确定嗜盐菌株的生长盐浓度范围和最适生长盐浓度。

11 极端真菌降解毒素、钝化重金属的指标及检测方法

11.1 极端真菌降解发霉粮食、饲料中毒素的指标及检测方法

11.1.1 降解指标：极端真菌降解毒素的降解率 $\geq 80\%$ ，并且降解后的毒素含量符合GB 2761-2017和

GB 13078-2017 的要求。

11.1.2 检测方法:

- a) 高效液相色谱或质谱联用等检测方法;
- b) 酶联免疫 ELISA 试剂盒检测法;
- c) 毒素荧光定量快速检测试纸条检测法;
- d) 毒素荧光定量快速检测仪检测法。

11.2 极端真菌钝化重金属的指标及对其耐受性的检测方法

11.2.1 钝化指标见 3.7 的注。

11.2.2 极端真菌对重金属耐受指数的测定方法:

极端真菌对重金属最小抑制浓度 (MIC) 的测定方法。

12 极端真菌全基因组 DNA 的提取

12.1 基因组 DNA 提取总则

12.1.1 基因组 DNA 的提取程序包括: 培养、裂解、提取、纯化、检测。

12.1.2 基因组 DNA 提取质量要求: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值应为 1.8~2.0, 且 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值大于 2.0。

12.1.3 所使用的 EP 离心管、枪头均须灭菌, 烘干冷却后使用。

12.2 基因组 DNA 的提取

提取步骤如下:

- a) 在 PDA 培养基中活化在 8.3 中获得的纯菌株, 待菌株生长至培养皿的 2/3 时, 在无菌操作台里, 用无菌棉签刮取适量菌丝, 放入无菌的 1.5mL EP 离心管, 在管盖上做好菌株标记, 投入液氮中。取出后迅速用无菌研磨棒将菌丝研磨成粉;
- b) 加入 600μL CTAB 溶液, 充分震荡混匀, 于金属浴中 98℃ 加热 3min;
- c) 将样品冰浴至接近室温, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1) 溶液, 上下颠倒混匀, 于小型离心机 4℃、12000rpm 离心 5min;
- d) 取 300 μL 上清液于新的 EP 离心管中, 加入 2 倍体积的 -20℃ 预冷的无水乙醇, 轻轻颠倒混匀, 4℃, 12000rpm 离心 5min;
- e) 弃掉上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 4℃, 7500rpm 离心 5min;
- f) 吸去离心管底部多余液体, 晾干 10min 或金属浴 50℃ 烘干 5min;
- g) 加入 30μL~50μL 无菌的 ddH₂O 溶解沉淀, 即为真菌基因组 DNA;
- h) 用分光光度计测定 DNA 的含量, -20℃ 保存, 用于后续实验。

13 极端真菌 18s rDNA 基因片段的扩增

以下操作均在冰浴条件下进行, 所使用的 pcr 离心管、枪头均须灭菌, 烘干冷却后使用。具体步骤如下:

- a) 取出 12.2 h) 中保存的 DNA 溶液、2xTaq PCR StarMix、18s rDNA 基因引物对、无菌双蒸馏水, 放在冰盒上溶解;
- b) pcr 反应体系: 在 pcr 离心管中加入 25μL 2xTaq PCR StarMix, 10 μM 的正向引物和反向引物各 2μL, 加入 1ng~10ng 上述 DNA 溶液, 补足水分至 50μL;
- c) pcr 反应程序: 94℃ 反应 3min, 然后进入 30 轮循环反应, 每轮反应条件为: 94℃ 反应 30s, 50℃ 反应 30s, 72℃ 反应 40s, 最后在 72℃ 继续反应 10min, 4℃ 保存。pcr 扩增引物序列参见附录 B。

14 极端真菌的分子鉴定

14.1 将 13 c) 中的 PCR 产物送到相关的测序公司进行测序。将所得到的 DNA 完整序列分别上传至 Ensembl 数据库和 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 调取相近的模式菌株序列。根据同源性高低确定待测菌株的分类地位。

14.2 资料保存: 将菌株的编号、来源、属名、种名等相关数据记录于极端环境真菌分子鉴定记录表(参见表 A.2)。

15 极端真菌样品及种质资源保藏

15.1 技术要求

15.1.1 样品、菌株资源的保藏、入库、出库有详细的记录。

15.1.2 同一菌株选用两种或者两种以上的保藏方式, 并备份 5~10 份。

15.1.3 定期检查菌株保藏效果, 定期进行活化复壮。有污染或退化迹象时, 及时分离、纯化、复壮。每次检查均有详细的记录。

15.1.4 菌株的分离、纯化、保藏、复壮均在无菌条件下进行。

15.2 极端真菌样品保藏

15.2.1 在采集地点现场处理的样品在运输带回实验室或者转移入样品库的过程中保持温度不变, -80°C 保藏的样品用液氮或者干冰保存运输。

15.2.2 样品如需出库做进一步分离, 则在各种保存温度下进行无菌操作。

15.2.3 保存温度包括 50°C 、 4°C 、 -20°C 、 -80°C 等四种。

15.2.4 资料整理: 将样品名称、保存位置、采集日期、出库日期等相关参数记录于极端环境真菌样品保藏记录表(参见表 A.3)。

15.3 极端真菌菌种保藏

15.3.1 短期保藏(无菌操作)

短期保存方法如下:

- a) 斜面试种: 在 PDA 培养基中活化在 7.3 中获得的各种极端环境真菌纯菌株, 待菌株生长至培养皿的 $1/3$ 至 $1/2$ 时, 在菌落边缘挖取菌丝块(带少量培养基), 移接到 5.12 c) 的斜面培养基上。对产孢量大的菌种应挑取少量孢子点接在斜面培养基(如各种霉菌);
- b) 从不同极端环境样品中分离的菌株按照其特性, 分别在最适宜的温度中培养 3~7 天后, 保存在 4°C 或者 50°C ;
- c) 定期移植, 重复 15.3.1 a) 和 15.3.1 b) 步骤。

15.3.2 长期保藏(无菌操作)

15.3.2.1 滤纸片保存法

将 8.3 中获得的纯菌株转移至新 PDA 培养基上, 在菌体周围均匀放置适量的 $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$ 的无菌滤纸片, 待菌丝长满滤纸片后, 将滤纸片放到无菌的 1.5 mL 的 EP 管中(约 4 片/管), 做好标记, 将 EP 管放在超洁净工作台中过夜吹风干燥, 封口, 然后将 EP 管分别在室温、 4°C 、 -20°C 、 -80°C 的环境中保存。保藏时间一般为 1 年~4 年左右。

15.3.2.2 甘油保存法

30% 甘油与真菌孢子悬浮液以 1:1 的比例混合均匀, 封口, 做好标记, 保存于 -80°C , 保藏时间一般为 1 年左右。

15.3.2.3 真空冷冻干燥法

用 30% 甘油制备极端真菌孢子悬浮液, 在低温下快速将其冻结并抽成真空, 使水升华将样品脱水干燥, 并在真空下立即熔封, 最后置于低温保存, 使极端真菌处于休眠状态。保藏时间一般为 10 年~20 年左右。

15.3.3 资料整理

将菌株编号、拉丁学名、中文名称、培养温度、盐度、生物学特性等相关参数记录于极端环境真菌保藏记录表（参见表A.4）。

附 录 A

(资料性)

极端环境真菌样品采集、鉴定、保藏记录表格式

极端环境真菌样品采集记录见表A. 1, 极端环境真菌分离、分子鉴定记录见表A. 2, 极端环境真菌样品保藏记录见表A. 3, 极端环境真菌菌种保藏记录见表A. 4。

表A. 1 极端环境真菌样品采集记录表

				第	页	共	页
序号							
采样时间							
采样地点及环境描述							
经、纬度							
环境温度 (°C)							
样品盐度 (%)							
样品名称							
现场处理方式							
保存方式							
采样人							
记录人							
校对入							
备注							

表A. 2 极端环境真菌分离、分子鉴定记录表

				第	页	共	页
序号							
菌株编号							
18S rDNA 基因序列号							
菌株拉丁学名							
菌株种属名称							
菌株来源							
培养基							
培养温度							
降解毒素名称							
钝化重金属名称							
分离日期							
分离人							
鉴定日期							
鉴定人							
校对入							
备注							

表A.3 极端环境真菌样品保藏记录表

第 页 共 页			
序号			
采集地点及环境描述			
样品名称			
样品数量			
采集日期			
入库日期			
出库记录	样品名称		
	日期		
	数量		
	用途		
	取样人		
	经手人		
	样品使用结果		
备注			

表A.4 极端环境真菌菌种保藏记录表

基本信息			
菌株编号		采集地点及环境描述	
拉丁学名		样品名称	
中文名称		培养基	
保存日期		生物危害程度	
保存方式		18sDNA 基因序列号	
分离人		功能特性	
鉴定人		备注	
生物学特性信息			
菌落形态			
菌丝形态			
产孢特性			
培养温度	温度范围:	最适温度:	
培养 pH	pH 范围:	最适 pH	
培养盐度	盐度范围:	最适盐度	
毒素降解率			
重金属最小抑制浓度 (MIC)			
菌落形态图			
菌丝形态图			
孢子形态图			

附 录 B (资料性) 极端环境真菌的分子鉴定

B.1 各通用引物对适用范围

各通用引物对适用于从极端环境分离的真菌，如果一对引物无法将菌株鉴定到种的水平，应选用其他引物对构建多基因联合系统发育树，将菌株鉴定到种的水平。

B.2 真菌 18S rDNA 基因序列 PCR 扩增通用引物对

引物序列 (5' — 3')，扩增DNA片段在500~750bp (碱基对)。

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

B.3 β -微管蛋白 (β -tubulin) 基因序列 PCR 扩增通用引物对

引物序列 (5' — 3')，扩增DNA片段495bp。

BT2a: GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC

BT2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

B.4 钙调蛋白 (Calmodulin CaM) 基因序列 PCR 扩增通用引物对

引物序列 (5' — 3')，扩增DNA片段787 bp。

CalF: AGCAAGTCATCTCCGAGTTCAAGG

Cal R: CTTCTGCATCAYCTGGACG

参 考 文 献

- [1] GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- [2] GB/T 30744-2014 深海微生物样品前处理技术规范
- [3] 魏景超. 真菌鉴定手册. 1979. 9, 上海科学技术出版社出版
- [4] Fungi in extreme environments: Ecological and biotechnological significance. Chapter 4: Haloalkaliphilic fungi and their roles in the treatment of saline-alkali soil; Wei Yi and Zhang Shi-Hong; Sonia Tiquia-Arashiro & Martin Grube(edit-in-chief), 2019. Springer Publishers. DOI: 10.1007/978-3-030-19030-9_27
- [5] Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology. Chapter 14: Fungal nanoparticles formed in saline environments are conducive to soil health and remediation; Yi Wei, Li-Na Chen, Zi-Yu Zhang, Chi Zhu, Shi-Hong Zhang*; Ram Prasad & Elisabet Aranda(edit-in-chief), 2018, p317-341. Springer International Publishing AG. ISBN_978-3-030-02368-3. DOI: 10.1007/978-3-030-02369-0_14
- [6] Mycoremediation and Environmental Sustainability. Fungal Biology, Chapter 12: Applications of haloalkaliphilic fungi in mycoremediation of saline-alkali soil. Zhang Shi-Hong and Wei Yi; Ram Prasad (Editor-in-Chief), 2017. p217-233. Springer International Publishing AG. ISBN: 9 78-3-319-68956-2. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_12
- [7] Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology. Part I, Chapter 2: The genetic basis of abiotic stress resistance in extremophilic fungi: the genes cloning and application. Zhang Shi-Hong; Diane Purchase (Editor-in-Chief), 2016, p29-42. Springer Press. ISBN 978-3-319-42850-5. DOI : 10.1007/978-3-319-42852-9_2. <http://www.springer.com/gb/book/9783319428505#aboutBook>
- [8] Marine Microbial Bioremediation. Chapter 2: Applications of Marine-Derived Fungi: Biocontrol, Cellwall Degradation and Soil Remediation. Yi Wei, Ziyu Zhang, Zhugang Li, Yu Li, Shi-Hong Zhang; Vala, A.K., Dudhagara, D.R., & Dave, B.P. (Editor-in-Chief), 2021, p25-56. Science Publishers CRC Press, USA. DOI: 10.1201/9781003001072-2
- [9] Beneficial Microorganisms in Agriculture. Chapter 11: Wei Yi, Zhang Ziyu, Huang Yuqian, Ram Prasad, Zhang Shi-Hong, Extreme microorganisms for sustainable agriculture; Ram Prasad & Shi-Hong Zhang (Eds.). 2022, Springer Press
- [10] Beneficial Microorganisms in Agriculture. Chapter 12: Wei Yi, Zhang Ziyu, Li Feng-Lan, Zhang Shi-Hong, Molecular basis of stress tolerant genes in extreme microorganisms; Ram Prasad & Shi-Hong Zhang (Eds.). 2022, Springer Press
- [11] Beneficial Microorganisms in Agriculture. Chapter 13: Wei Yi, Zhang Ziyu, Yu Shujun, Liang Hao, Ali Noman, Zhang Shi-Hong, Cellulose degradation microorganisms and environmental friendly solution to the agricultural waste management (Eds.). 2022, Springer Press
- [12] Wei Y, Zhang S-H. Abiostress resistance and cellulose degradation abilities of haloalkaliphilic fungi: applications for saline-alkaline remediation. *Extremophiles*, 2018, 22: 155-164. 10.1007/s00792-017-0986-3