

秸秆内丝状真菌阻止外源真菌入侵

刘保平, 周连仁, 王宏燕

东北农业大学资源与环境学院, 寒地黑土资源利用与保护实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要: 选取降解秸秆较快且形态差异较大的 10 株丝状真菌, 以玉米秆芯为材料, 研究其降解秸秆的协同性。结果表明: 供试 10 株丝状真菌在侵入秸秆内部后都具有排斥其他丝状真菌侵入的倾向。利用平板对峙法研究这 10 株丝状真菌在培养基 PDA 上生长的相互影响, 结果表明供试 10 株丝状真菌也普遍具有相互竞争和抑制的作用, 没有发现促进生长现象。根据菌落形态、菌丝和孢子形态对 10 株丝状真菌进行了鉴定。在这 10 株真菌中, 有 3 株(F1、F7、F10)是循环抑制, 分类学上分别归属于 *Mucor lamprosporus* lender, *Neurospora sitophila* Sh. Et dodge 和 *Phytophthora cactorum*(L. et C.)Schrot.。结论: 侵入秸秆内 10 株丝状真菌阻止外源真菌入侵。

关键词: 秸秆; 降解; 玉米芯; 丝状真菌; 循环抑制

中图分类号: Q938.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2009) 02-0586-04

我国秸秆资源极其丰富, 在发电、制沼气、还田、制饲料以及其它方面利用潜力巨大^[1]。秸秆还田可提高冲积土和紫色土稻田土壤不同形态碳素含量和碳库管理指数及养分含量^[2]。翻压法秸秆还田简单易于操作, 但压量过大、土壤水分不足会妨碍耕作、影响出苗、害虫增加造成减产^[3]。秸秆可制成优质堆肥, 不足是耗时长^[3]。利用微生物降解秸秆促进秸秆还田是修复东北寒地退化黑土的有效途径。

秸秆主要是由纤维素、半纤维素和木质素以及少量蛋白质、脂肪、醇类、醛、酮和有机酸等物质构成的结晶体^[4-6]。大自然中生物质繁衍繁殖最终多数经过生物特别是微生物降解腐烂, 自然界并不缺乏降解秸秆的微生物。降解秸秆的微生物种类很多, 很多真菌、放线菌和细菌种类能降解纤维素和半纤维素^[4], 担子菌的一些属以及少量细菌和放线菌能降解木质素^[5]。一般而言细菌降解木质素的能力比真菌低得多^[7]。真菌对木质纤维素的分解归因于它们的高效酶系统, 真菌有两种细胞外酶系统: 一种是水解酶, 另一种是细胞外特殊的氧化酶, 前者产生多糖的降解酶, 后者则负责木质素的降解和苯环的拆开^[8]。

本文试图从真菌之间的竞争性来探讨复合微生物制剂是否具有协同效果, 降解秸秆的酶最初是微生物所分泌, 微生物的生长活性也是降解效率的重要因素, 同时微生物的生物量增长也是秸秆降解程度的重要指标。与其他微生物的竞争和拮抗是其生长活性的重要影响因素之一, 并最终影响到降解秸秆酶的分泌。侵入到秸秆内部的微生物种类及其

相互之间有何作用? 陈旧秸秆表面及内部着生的微生物优势种类及其竞争性如何? 对这些问题的回答将有助于指导人工控制的秸秆微生物降解研究和应用。本文着重从真菌之间的竞争性以及秸秆的组织结构屏障探索微生物对秸秆的降解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 真菌培养基

PDA (土豆葡萄糖琼脂培养基) 成品 19 g, 定容至 500 mL 高压蒸汽灭菌。

1.1.2 供试堆肥

取自黑龙江省哈尔滨市东北农业大学园艺试验站。

1.1.3 供试秸秆

水稻、大豆和玉米 3 种秸秆, 获赠于黑龙江哈尔滨靠河寨养牛场。

1.1.4 十株降解秸秆丝状真菌

本实验室分离。

1.2 方法

1.2.1 秸秆内丝状真菌分离法

用酒精对秸秆进行表面灭菌, 用土豆葡萄糖琼脂培养基培养并分离秸秆中丝状真菌。

1.2.2 秸秆携带真菌展示法

大豆、水稻、玉米 3 种新鲜和放置 1 年陈旧秸秆各取 3 个重复。将秸秆剪成 5 cm 小片段破开放于 PDA 平皿上 30 °C 培养数天。试验重复 2 次。

1.2.3 丝状真菌秆芯内竞争性

玉米秆芯剪成(1~2) cm×(2~3) cm 片段高压蒸汽灭菌, 放于倒有固体 PDA 培养基的平皿中同

基金项目: 国家 863 项目 (20060110z4023)

作者简介: 刘保平(1976 年生), 男, 讲师, 博士研究生, 主要研究方向为作物生态学。E-mail: liubaoping@neau.edu.cn

收稿日期: 2009-02-12

时接种真菌 A，30 ℃培养 10 d，将玉米秆芯片段取出放于已经事先接种并长满真菌 B 的 PDA 平皿上培养 10 d。然后将这玉米秆芯片段取出用酒精对秸秆进行表面灭菌，置于 PDA 培养基上培养秆芯片段内部微生物。实验重复两次。

1.2.4 丝状真菌在 PDA 培养基上的竞争性

采用平板对峙法^[9]，分别接种 2 株真菌置于平板的两端，30 ℃培养 5~10 d，测定其竞争性，以接种相同菌株作对照。实验重复两次。

1.2.5 两株真菌的竞争性测定方法

根据两株真菌在同一 PDA 平皿上的长势，测定其竞争性。菌落几乎不长记为“- -”，菌株生长中度受抑记为“-”，菌株生长轻度受抑记为“-”，菌株菌落生长在相互接触处停下，没有明显的生长受抑的记为“o”，生长轻度加快记为“+”，生长中度加快记为“++”，生长明显加快记为“+++”。实验重复 2 次。

1.2.6 真菌鉴定

采用文献[10]描述的方法鉴定。

2 结果与分析

2.1 秸秆内丝状真菌分离与分析

从供试堆肥中用方法 1.2.1 分离秸秆内丝状真菌时，发现大豆、水稻、玉米 3 种秸秆小片段都能长出丝状延伸菌落，这些菌落大多是沿平板培养基匍匐生长。每个小片段都只有 1~4 种形态的菌落，同一平皿上不同菌落之间界限分明。同一种秸秆不同片段重复分离丝状真菌试验时，难以发现相同形态的菌落，同一根秸秆的不同部位小片段也长出不同的菌落。选取一些半腐烂秸秆洗净表面能看到色泽深浅不一的斑状表面。

这些结果表明：丝状真菌侵入秸秆后阻止其他真菌入侵，丝状真菌可以侵入未被其它真菌侵入的秸秆内部，在秸秆内部定植后将阻止其他真菌入侵。秸秆在浸渍在湿润的黑土中不久就会被不同的真菌侵入，在秸秆片段内部形成某种丝状真菌的单

菌落区。上述半腐烂秸秆表面不同的斑纹就是不同的真菌单菌落边缘。同一秸秆小片段内部可以分离到 2 株以上丝状真菌可能是因为小片段可以分为不同的微空间，每一微空间只有一种菌落。

2.2 十株丝状真菌在玉米秸秆秆芯内的竞争

从分离的丝状真菌中选取形态差异较大的 10 株真菌作试验菌株，用本文方法中的 1.2.3 描述的步骤对 10 株菌两两试验（表 1）。

表 1 十株丝状真菌在玉米秸秆秆芯内的竞争
Table 1 competition of the 10 strains of filamentous fungi in the core of the maize stalks

菌株 A	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
菌株 B*	9株	9株	9株	9株	9株	9株	9株	9株	9株	9株
分离	F1	F2	F3	F4	F5	F6+F7	F7+F1	F8	F9	F10

*：除了 A 外其他 9 株菌

结果表明：供试 10 株丝状真菌中只有 F7 和 F1 可以分别侵入分别被 F6 和 F7 占据的玉米秸秆秆芯。其余的 8 株，每一株单独侵入秸秆后将阻止其他 9 种真菌的侵入。

2.3 十株丝状真菌在 PDA 上的竞争

以这 10 株真菌为材料，继续研究它们在培养基 PDA 上的竞争性。用平板对峙法测定供试 10 株菌在倒有 PDA 固体培养基平皿上的两两相互作用，以同种菌株为对照，两次重复试验结果完全吻合（表 2）。

结果表明：供试菌中 F1 强烈抑制 F6、F7、F8、F9，但受 F10 和 F5 的强烈抑制，F2 也抑制 F7、F8、F10，但受 F1 的抑制。F3 受 F1 和 F5 的抑制，但是其它菌和它几乎无相互作用。F4 和 F1 相互抑制，也受 F7 的抑制。但是和其它菌之间作用较小或没有相互作用。F5 受 F7 的抑制，和其它菌之间相互作用较小或没有作用。F6 受 F1 和 F7 的抑制，但是和其它菌很少有相互作用。F7 抑制 F4、F5、F6、F9、F10 但受 F1、F2 的抑制。F8 受 F1、F2 的抑制，和其它菌相互作用较小。F9 受 F1 和 F7 的抑制，但

表 2 十株丝状真菌在 PDA 上的竞争
Table 2 competition of the 10 strains of filamentous fungi on the PDA medium

Fungi	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
F1	o o	o -	o --	--	---	o ---	o ---	o ---	o ---	---
F2	- o**	o o	o o	o -	o o	-	o --	o --	o -	o --
F3	-- o	o o	o o	o o	- o	o o	o o	o o	o o	o -
F4	--	- o	o o	o o	- o	o o	-- o	- o	o o	-
F5	- ---	o o	o --	o -	o o	o o	--	-	- o	o -
F6	--- o	-	o o	o o	o o	o o	--- o	o o	o o	o o
F7	--- o	-- o	o o	o --	-	o ---	o o	-	o ---	o ---
F8	--- o	-- o	o o	o -	-	o o	-	o o	o o	o o
F9	--- o	- o	o o	o o	o -	o o	--- o	o o	o o	o o
F10	- ---	-- o	- o	-	- o	o o	--- o	o o	o o	o o

**：-|o=F2|F1，其它类同

是和其它菌很少有相互作用。F6 和 F9 很相似。F10 抑制 F1 但受 F7 的抑制。

2.4 十株供试真菌的鉴定结果

十株供试真菌的鉴定结果如表 3。F6 和 F9 都属于镰刀霉属，两者菌落形态和孢子形态比较相似；而 F1 和 F2 都为毛霉属，菌落形态差别较大，F1 棉花状菌丝中密布肉眼可见黑色孢子囊，F2 棉花状菌丝中很难用肉眼看清孢子囊；F4 和 F8 都为腐霉属，两者之间的竞争可以明显看到菌落形态区别，可能为不同的种。

表 3 十株丝状真菌的鉴定

Table 3 Identification of 10 strains of filamentous fungi

Fungi	中文名	拉丁名
F1	闪孢毛霉	<i>Mucor lamprosporus lender</i>
F2	罗氏毛霉	<i>Mucor ramannianus Moeller</i>
F3	黄曲霉	<i>Aspergillus flavus Lk.</i>
F4	不育腐霉	<i>Pytium afertile Kanouse et Humphrey</i>
F5	米根霉	<i>Rhizopus oryzae Went et Pr.Geerlings</i>
F6	禾谷镰刀霉	<i>Fusarium gramineum Cda.</i>
F7	面包脉孢霉	<i>Neurospora sitophila Sh.et Dodge</i>
F8	多形腐霉	<i>Pythium polymorphon sideris</i>
F9	燕麦细镰刀霉	<i>Fusarium avenaceum(Fr.)Sacc.</i>
F10	苹果疫霉	<i>Phytophthora cactorum(L.et C.)Schrot.</i>

结果表明：降解秸秆的 10 株真菌中，分别有毛霉、根霉、曲霉、腐霉、脉孢霉、镰刀霉和疫霉。

3 讨论

秸秆降解指任何对秸秆组织结构和组成秸秆的分子具有破坏作用的过程。秸秆致密结构是没有缝隙或者缝隙是纳米级的，而丝状真菌直径一般是微米级的，所以侵入致密秸秆的丝状真菌都必定对秸秆组织结构和组成秸秆的分子具有破坏作用，因此凡是侵入致密秸秆的丝状真菌都可以认定为降解菌。

本文供试 10 株真菌中，每株真菌菌丝侵入秸秆占据秸秆内一定空间后阻止其它丝状真菌菌丝侵入这部分空间。土壤中微生物很多，但是浸渍在土壤中的秸秆特别是大片段秸秆却难以快速而彻底降解，秸秆的致密结构是主要原因之一，秸秆内丝状真菌阻止其它丝状真菌入侵可能是另一个主要原因。其它真菌和细菌对已经有丝状真菌侵入的秸秆片段的降解只限于表面或者当秸秆内丝状真菌已经衰亡时。对秸秆的粉碎可以减小丝状真菌的这种作用。其机理是扩大秸秆比表面积，使秸秆表面能接触到更多的降解微生物及其分泌的酶类，从而提高降解效率。

由多个菌株组成的混合菌剂是利用微生物降解秸秆的研究方向^[6,11]。使用混合菌剂对稻草进行发酵可以产生有机酸^[12]。稻草的固体发酵生物量可

以用磷脂酸作为指标，与接种单纯一种微生物相比，接种 *Phanerochaete chrysosporium* 和土壤微生物可以提高发酵降解稻草的效率^[13]。往玉米秸秆等几种生物质中共接种 *Clostridium thermocellum* JN4 和 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 可以提高氢化物产量^[14]。将各种高效菌株制成的混合菌剂对秸秆的降解不一定是简单的加和效应^[6]。本研究表明，丝状真菌之间的这种竞争性和抑制性可能是一个重要原因。真菌菌落形态变化是真菌之间竞争的宏观反应。在供试 10 株真菌中没有发现被促进生长现象。10 株供试菌之间的相互关系形成网状。比较特别的是其中 3 株菌：F10 抑制 F1，F1 抑制 F7，F7 抑制 F10。这 3 株真菌形成循环抑制关系，分类学上分别属于 *Mucor lamprosporus lender*，*Neurospora sitophila* Sh. Et dodge 和 *Phytophthora cactorum*(L. et C.)Schrot.。相比从酶的活性来分析混合菌剂的协同效果，从菌落之间的竞争和抑制来分析属于宏观方法，更加简便和直观。

参考文献：

[1] 汪坊, 汪炜. 我国秸秆资源开发利用综述[J]. 资源开发与市场, 2008, 24(11): 1009-1012.
WANG Fang, WANG Wei. Review of development and utilization of straw resources in China[J]. Resource Development & Market, 2008, 24(11): 1009-1012.

[2] 刘定辉, 蒲波, 陈尚洪, 等. 秸秆还田循环利用对土壤碳库的影响研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(5): 1316-1319.
LIU Dinghui, PU Bo, CHEN Shanghong, et al. Effect of crop straw returning to paddy soil on soil carbon pool in Sichuan Basin[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2008, 21(5): 1316-1319.

[3] 张文朴. 加强秸秆综合利用研究促进农业循环经济发展[J]. 中国资源综合利用, 2008, 26(10): 19-21.
ZHANG Wenpu. Strengthen research and development progress on comprehensively utilization of straws to promote the development of agricultural recycling economy[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2008, 26(10): 19-21.

[4] 史央, 蒋爱芹, 戴传超, 等. 秸秆降解的微生物学机理研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 47-50.
SHI Yang, JIANG Aiqin, DAI Chuanchao, et al. Advanced in microbiological mechanism and application of straw degradation[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(1): 47-50.

[5] 徐广, 刁治民, 曾智科, 等. 微生物降解秸秆的研究进展与前景展望[J]. 科技资讯, 2007, 22: 137.
XU Guang, DIAO Zhimin, ZENG Zhike, et al. Developments and future overview on the degradation of stalk by microorganisms[J]. Science and Technology, 2007, 22: 137.

[6] 黄茜, 黄洪洪, 江木兰, 等. 木质素降解菌的筛选及混合菌发酵降解秸秆的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 66-70.
HUANG Xi, HUANG Fenghong, JIANG Mulan, et al. The selection of lignin-degrading fungus and the straw fermentation by mixed

- strains[J]. China Biotechnology, 2008, 28(2): 66-70.
- [7] 陈文新. 土壤和环境微生物学[M]. 北京:北京农业大学出版社,1990:18.
CHEN Wenxin. Edaphic & Environmental Microbiology [M]. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1990: 18.
- [8] CARMEN S. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27: 185-194.
- [9] 方中达. 植物病理研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979: 102-166.
FANG Zhongda. Research Methods of Plant Pathology[M]. Beijing: Agricultural Press, 1979: 102-166.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 31, 33, 38, 64, 71, 197, 497, 632-633.
WEI Jingchao. A Manual for Fungi Identification[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technology Press, 1979: 31, 33, 38, 64, 71, 197, 497, 632-633.
- [11] GUO P, WANG X F, ZHU W B, et al. Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20: 109-114.
- [12] LIU J B, WANG W D, YANG H Y, et al. Process of rice straw degradation and dynamic trend of pH by the microbial community MC1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, 18(6): 1142-1146.
- [13] YU M, ZENG G M, CHEN Y N, et al. Influence of Phanerochaete chrysosporium on microbial communities, lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw[J]. Process Biochemistry, 2009, 44: 17-22.
- [14] LIU Y, YU P, SONG X, et al. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(12): 2927-2933.

Filamentous fungi in the stalks prevent other fungi penetrating

Liu Baoping, Zhou Lianren, Wang Hongyan

Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Cooperate in the degradation procedure in the core of the maize stalks between each 2 strains among 10 strains of filamentous fungi that could most effectively degrade stalks and colony morphologically different were studied. Results showed that each of the 10 filamentous fungi have the tendency to prevent other fungi penetrating into the space it already occupied. The method of two fungi grow on the medium of one plate were recruited in the study of the effects between each two strains among the 10 strains of fungi on the PDA medium. Results showed that competition and antagonism were seen between most of the 10 fungi, no growth acceleration were showed. The 10 strains of fungi were identified according the morphology of the colonies, the mycelium and the spores. Three (F1、F7、F10) of the 10 strains of fungi form an inhibition cycle, the three fungi taxonomically belong to *Mucor lamprosporus* lender, *Neurospora sitophila* Sh. Et dodge and *Phytophthora cactorum*(L. et C.) Schrot.. In conclusion, the 10 filamentous fungi in the stalks prevent other fungi penetrating.

Key words: stalk; degradation; maize core; filamentous fungi; inhibition cycle