

# 降解沟叶结缕草枯草层的真菌菌株的初选

袁康培 徐礼根 冯明光

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310029)

**摘要:** 从沟叶结缕草枯草层、土壤和腐烂木头上共分离到 45 株真菌菌株, 经刚果红透明圈法初筛和纤维素酶活力测定法复筛后共选出 6 株可用于降解沟叶结缕草枯草层的菌株。它们对沟叶结缕草植株无致病作用, 其中 HU43 (*Aspergillus awamori*) 生长速度最快, 降解羧甲基纤维素钠的能力最强, 经 3 d 固体发酵后纤维素酶活力达  $35.7 \text{ U g}^{-1}$ , 经 25 °C 恒温保湿 7 d 后对沟叶结缕草枯草的降解率达 24.34 %。

**关键词:** 沟叶结缕草; 真菌菌株; 筛选; 纤维素酶; 降解; 草坪; 枯草层

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0682-03

## Preliminary Screening of Fungal Strain Decomposing the Thatch of Turfgrass *Zoysia matrella*

Yuan Kangpei, Xu Ligen, and Feng Mingguang

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Forty-five fungal strains were isolated from turf thatch of *Zoysia matrella*, soil and rotten wood, and six among them were selected out for decomposing the thatch of *Zoysia matrella* efficiently by preliminary screening with Congo-red-clear-zone method and re-screening with the assay of cellulase activities. Results showed that all of them had no pathogenicity to live turfgrass of *Zoysia matrella*, and the HU43 strain identified as *Aspergillus awamori* expressed the highest growth rate, as well as the greatest efficiency to decompose sodium carboxymethyl cellulose. The cellulase activity of HU43 reached  $35.7 \text{ U g}^{-1}$  after 3 days by solid state fermentation. After being incubated at 25 °C under high moist condition for 7 days, 24.34 % of withered grass of *Zoysia matrella* had been decomposed by this strain.

**Key words:** *Zoysia matrella*; Fungal strain; Screening; Cellulase; Decompose; Turf thatch

### 1 目的、材料与方法

枯草层是由一些未分解的草坪草的根、茎、叶积累在表层土壤上形成的, 主要成分是纤维素和木质素。枯草层阻碍水分渗透与气体交换, 造成根系吸水吸肥和通气困难, 助长致病菌的繁殖, 易造成草坪病害、虫害、旱害和寒害等, 最终造成草坪成片退化<sup>[1]</sup>。目前解决枯草层的办法有器械打孔、垂直切割、表层覆土(沙)、冬季火烧等, 但都费时费力, 效率低下, 且对草坪构成了伤害。从环境保护及应用便利等方面考虑, 利用微生物来控制枯草层将是一个发展方向<sup>[1, 2]</sup>。如能筛选到对枯草分解能力强而对活草没有致病作用且能产生大量分生孢子的真菌, 就可制成孢子悬浮液喷洒到草坪上, 达到生物降解枯草层的目的。目前已有利用 *Bacillus* 和 *Streptomyces* 来分解枯草层的报道<sup>[3~5]</sup>。

沟叶结缕草 (*Zoysia matrella*) 是暖季型草坪草中最容易积累枯草层的草种, 在我国应用广泛, 故以此为试验材料。

菌种的分离与初筛: 分离培养基为 CMA (corn meal agar), 加入  $0.25 \text{ g L}^{-1}$  penicillin G 和 streptomycin sulfate 以抑制细菌生长。菌种分离自腐烂的沟叶结缕草枯草、土壤和腐烂木头。初筛培养基为羧甲基纤维素钠  $3.0 \text{ g}$ , 琼脂  $20.0 \text{ g}$ , 蒸馏水  $1000 \text{ mL}$ 。灭菌后冷却至  $50 \text{ °C}$ , 加入  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  的刚

收稿日期: 2004 - 03 - 24; 修回日期: 2004 - 07 - 20

果红。用打孔器在培养了 2 d 的菌落边缘打取直径 4 mm 的接种块, 移至初筛培养基平板中央<sup>[6]</sup>。  
25 下培养 2 d 后观测菌落透明圈。

纤维素酶活力测定: 吸取 0、200、400、600、800、1000 和 1200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的葡萄糖溶液各 0.5 mL 于试管中, 加入 pH 4.8 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液 1.5 mL、DNS (3,5-二硝基水杨酸) 3.0 mL, 沸水浴 10 min, 取出加入蒸馏水 10.0 mL, 混匀冷却后在分光光度计 550 nm 处比色。求出葡萄糖含量 ( $\mu\text{g}$ ) 和吸光度 A 之间的回归方程。

在 250 mL 三角瓶中装入麸皮 5.3 g、甘蔗渣粉 4.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g、蒸馏水 15 mL, 灭菌后接入待复筛的菌株, 25 培养 2~4 d 后每瓶加入 100 mL 无菌水, 捣碎浸泡 1 h 后离心, 上清液即为待测酶液。用蒸馏水稀释待测酶液, 将吸光度控制在 0.2~0.4。试样管 (两支): 取经 40 预热的稀释酶液 0.5 mL、pH 4.8 的缓冲液 1.0 mL 和 1.0% 羧甲基纤维素钠溶液 0.5 mL, 40 恒温反应 30 min, 加入 DNS 试剂 3.0 mL 以终止反应。对照管: 先加入稀释酶液、缓冲液和 DNS 试剂, 40 恒温反应 30 min 后再加入羧甲基纤维素钠溶液。将二者置于沸水浴中沸腾 10 min, 取出加入蒸馏水 10.0 mL, 混匀冷却后在 550 nm 处测定吸光度。利用回归方程计算出还原糖的含量<sup>[7,8]</sup>。1 个酶活力单位 (U) 是指在上述条件下, 每 min 水解羧甲基纤维素钠生成相当于 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖的还原糖的酶量。

致病性测定: 在培养 4 d 的发酵料中加入培养料干质量 10 倍的无菌蒸馏水, 捣碎后用纱布过滤, 所得滤液即为孢子悬浮液。将孢子悬浮液的含孢量配置成  $10^7$  CFU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 按 200 mL  $\cdot \text{m}^{-2}$  直接喷至沟叶结缕草草坪上, 对照喷以同量无菌蒸馏水。所有处理重复 3 次。覆盖黑色薄膜以保温保湿, 3 d 后揭开。

沟叶结缕草枯草降解量的测定: 将沟叶结缕草枯草洗净烘干后剪成 1 cm 长的小段, 称取 20 g 放入直径 15 cm 的培养皿中, 经 121 灭菌 15 min 后喷入 25 mL 孢子悬浮液, 对照喷同量的无菌蒸馏水。所有处理重复 3 次。25 恒温保湿 7 d 后用清水漂洗, 烘干至恒重, 称量并计算降解量。

## 2 结果

### 2.1 菌株筛选结果

共分离到 45 株真菌菌株, 其中 12 株在其菌落周围呈现明显的透明圈。考虑到所选菌株的生长速率要快、透明圈直径要大、能产生大量的分生孢子, 再兼顾菌株的分离来源, 共选择了 6 株由浙江大学微生物研究所鉴定的菌株用于复筛, 在初筛培养基上培养 2 d 后菌落和透明圈的直径范围分别为 18.6~33.5 mm 和 27.5~46.0 mm, 其中 HU43 的生长速度最快, 降解羧甲基纤维素钠的能力最强 (表 1)。

经 2 d 固体发酵后, 6 株菌株均开始形成分生孢子, 纤维素酶活力达  $9.5 \sim 28.8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 3 d 后均产生大量的分生孢子, 纤维素酶活力达  $11.5 \sim 35.7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ , 其中 HU24、HU43、HU66 和 HU78 达到了各自的酶活高峰; 4 d 后纤维素酶活力达到  $13.2 \sim 34.4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ , 其中 HU29 和 HU71 的酶活继续升高 (表 1)。在 3 批测定结果中均以 HU43 的酶活为最高。

### 2.2 致病性

经连续 20 d 的观察, 发现 6 株菌株对沟叶结缕草活的植株没有任何影响, 说明它们对沟叶结缕草植株无致病作用。

### 2.3 对沟叶结缕草枯草的降解作用

经 25 恒温保湿 7 d 后, HU43 对沟叶结缕草枯草的降解能力最强, 降解率达到 24.34%, 其次为 HU66 和 HU24, 分别为 19.09% 和 16.86% (表 1)。对照的降解率为 1.71%, 可能是受湿热灭菌的影响, 少部分物质降解或被清洗掉的缘故。

表 1 菌株的菌落和透明圈直径、纤维素酶活力及降解沟叶结缕草枯草的能力

Table 1 The diameter of colony and clear zone, cellulase activities of six strains and its efficiency to decompose the thatch of *Zoysia matrella*

编号 Code	菌种名称 Name of fungus	分离来源 Source	菌落直径 Diameter of colony (mm)	透明圈直径 Diameter of clear zone (mm)	纤维素酶活力 Cellulase activity(Ug <sup>-1</sup> )			干质量 Dry mass(g)		降解率 Decomposition rate (%)
					2 d	3 d	4 d	降解前 Before decomposition	降解后 After decomposition	
HU24	<i>Aspergillus</i> sp.	沟叶结缕草枯草层 Thatch of <i>Zoysia matrella</i>	24.3	33.0	17.2	26.3	23.1	17.50	14.55	16.86
HU29	<i>Penicillium</i> sp.	沟叶结缕草枯草层 Thatch of <i>Zoysia matrella</i>	26.0	36.4	18.5	25.0	27.6	17.50	15.29	12.63
HU43	<i>Aspergillus</i> <i>awamori</i>	沟叶结缕草枯草层 Thatch of <i>Zoysia matrella</i>	33.5	46.0	28.8	35.7	34.4	17.50	13.24	24.34
HU66	<i>Aspergillus</i> sp.	土壤 Soil	25.0	38.7	21.0	32.2	30.4	17.50	14.16	19.09
HU71	<i>Trichoderma</i> sp.	土壤 Soil	18.6	27.5	9.5	11.5	13.2	17.50	15.93	8.97
HU78	<i>Penicillium</i> sp.	腐烂木头 Rotten wood	31.8	40.2	22.3	26.1	24.9	17.50	14.87	15.03
对照 Control								17.50	17.20	1.71

注：表中数据均为 3 次重复的平均值。  
Note: Data were expressed as means of triplicate flasks.

3 讨论

刚果红透明圈法简单易行、直观高效，与酶活力的测定结果有很强的相关性（表 1），避免了烦琐的酶活力测定过程，可用于纤维素酶菌种的初选。该法将羧甲基纤维素混入琼脂平板，刚果红与吡喃型D - 葡萄糖残基发生反应使平板培养基呈紫色，如某菌株可产纤维素酶，则其菌落周围培养基中的羧甲基纤维素会被酶解，出现一个圆型透明圈，其直径大小与酶活力对数成正比<sup>[9]</sup>。

通过微生物分解后，可将枯草转化为腐殖质，不仅增加土壤肥力，还能改善土壤结构，有利于草坪草的生长。据 Ledebøer 报道，只应用纤维素酶未能促进枯草层的分解<sup>[2]</sup>。本试验结果表明，HU43 (*Aspergillus awamori*) 对沟叶结缕草植株无致病性，生长速度快，可产生大量的分生孢子，纤维素酶的活力高，降解枯草的能力强，是一株可望用于降解沟叶结缕草枯草层的真菌菌株。

为了使微生物制剂达到最佳效果，筛选出对枯草分解能力强的菌株是首要的一环，其次可考虑在制剂中添加一些辅剂，如可使孢子免受紫外线和草坪杀菌剂杀伤的保护剂、能促进孢子萌发和菌丝生长的营养剂以及能促使菌丝分泌酶的诱导剂等，最后还要辅之以相应的草坪养护管理措施。

参考文献：

1 苟文龙, 白史旦, 张新全. 栽培管理措施对草坪枯草层的影响. 草原与草坪, 2001, 3: 5~8

2 Ledebøer FB, Barr J P. Ineffectiveness of commercial microorganism inoculum in breaking down thatch in common bermudagrass in Hawaii. Hortscience, 1976, 11: 488~489

3 Chamberlain K, Crawford D L. Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46 (6): 550~558

4 Crawford D L. Use of *streptomyces* bacteria to control plant pathogens and degrade turf thatch. Official Gazette of the United States Patent & Trademark Office Patents, 1999, 1227 (3): Patent Number US 5968503

5 Shigemitsu Haruhiro. Bacillus decomposing turf pseudo thatch and thatch, and a microbial material containing the Bacillus. Official Gazette of the United States Patent & Trademark Office Patents, 2000, 1241 (4): Patent Number US 6165775

6 Flannigan B, Gilmour J E M. A simple plate test for xylanolytic activity in wood-rotting basidiomycetes. Mycologia, 1980, 72 (6): 1219~1221

7 Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, 1959, 31: 426~428

8 Raghukumar C, Raghukumar S, Chinnaraj A, et al. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. Botanica Marina, 1994, 37: 515~523

9 Dingle J, Reid W, Solomon E. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides, Application of the cup plate assay to the estimation of enzymes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1953, 4: 149~155