

一株葡萄孢属(*Botrytis*)真菌结皮效果的研究

邓振山¹, 赵佳福^{1,2}, 雷超¹, 李军³, 韦革宏⁴

(1. 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2. 高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
3. 延安市微生物研究所, 陕西 延安 716000; 4. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 从陕北毛乌素沙地生物结皮的下层中筛选得到一株真菌, 经鉴定, 表明该菌株属于葡萄孢属(*Botrytis*)。它能在生长繁殖过程中分泌出大量胞外黏多糖, 室内摇瓶振荡培养3 d黏度可达9 860 mPa·s, 产量达19.246 g/L, 通过采用薄层层析法对多糖的组分的测定, 初步表明该多糖主要由D-甘露糖和D-半乳糖组成。通过结皮试验, 结果表明该株真菌菌剂喷洒于流沙表面后, 能够形成约8.2 mm厚的一层具有粘结沙粒、保持水分的生物结皮层, 同时具有明显的减缓土壤中水分蒸发的效果。表明该菌株在荒漠化治理、恢复和保护生态环境方面具有重要的应用潜力。

关键词: 真菌; 胞外多糖; 微生物结皮; 保水

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2012)05-0200-05

微生物结皮(Microbiotic crust)是苔类、叶苔、蓝绿藻、地衣类、真菌和细菌, 以及许多景观中的常见的非维管束植物成分形成的十分复杂的聚合体^[1]。它与其它土壤表层结皮如维管束植物层^[2-3]、雨水作用形成的结皮和沉积物结皮有着本质的区别^[4]。其主要表现在它是沙土-植物-微生物之间长期相互作用的结果, 微生物是形成微生物结皮的组织者和建设者, 由于它们可产生胞外代谢物, 如多糖、脂类和蛋白质, 可起到胶结作用以稳定团聚体^[5]。微生物结皮广泛分布于干旱半干旱地区, 与生态环境是一个相互作用的整体, 对植被恢复与重建具有重要的生态学意义。国内外对微生物结皮在各生态过程中的作用已作了大量研究, 微生物因其极强的适应性和生存能力, 在生物结皮形成各阶段都起着积极的作用。土壤微生物的生长和活性与土壤酶活性的变化具有良好的相关性, 它的组成、分布和数量因沙丘类型和沙土层深度的不同而有所变化, 也受到季节和植被的影响。土壤微生物的生理代谢活动及数量变化可以改变沙土表面理化性质, 在土壤结皮的形成、植物营养的转化过程中发挥积极作用, 为植物生长创造了良好的条件^[6]。

众所周知, 荒漠化是当今国际社会极为关注的全球性的环境问题, 而我国则是受荒漠化危害最为严重的国家之一。目前, 利用微生物技术进行固沙方面的研究报道不多见。因此, 本试验通过对陕北榆林地区毛乌素沙地生物结皮下层中分离得到的一

株产黏性胞外多糖真菌的结皮能力和防沙保水作用的初步研究, 了解该菌的保水、固沙作用, 为利用生物技术治沙和改善生态环境方面提供理论依据和物种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集及供试菌株的来源 样品的采集: 于2006年春、秋两季分别在毛乌素沙地选择有生物结皮分布的典型沙垄结皮层采集土样, 4℃下保存, 备用。

供试菌株: 苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)由西北农林科技大学植保学院惠赠。

1.1.2 培养基

1) 筛选培养基: 土壤浸出液 300 ml, 琼脂条 16 g, 蒸馏水定容至 1 000 ml, pH 自然。121℃灭菌 25 min。

2) 斜面种子培养基: PDA 培养基^[7]。

3) 发酵培养基: 蔗糖 30 g/L, 蛋白胨 1 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, NaCl 0.1 g/L, pH 7.0~7.5。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化及鉴定 菌株筛选采用高倍稀释法, 将采集的上述土壤样品分别称取 10 g, 倍比稀释后涂筛选培养基平板, 28℃培养 2 d。待菌丝长出后, 挑取尖端菌丝移到新的固体平板上继续培养, 经几次纯化后得到纯化的产粘菌落, 斜面保存备

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 陕西省科技厅重大创新项目(2009ZKC-04-09); 陕西省普通高等学校重点学科专项资金建设项目

作者简介: 邓振山(1969—), 男, 陕西黄陵县人, 讲师, 博士, 主要从事微生物资源与利用和环境微生物学研究。E-mail: zhenshandeng214@yahoo.com.cn。

用^[7]。

菌株菌落形态观察及鉴定:采用插片法、载玻片水琼脂法保湿培养进行分类鉴定和形态特征观察,具体见文献^[7]。在PDA培养基上采用单菌丝挑取法培养出单菌落,记录菌落气生菌丝的疏密、表面形态、大小、颜色、质地、生长速度、边缘形态等。采用插片培养方法和载玻片水琼脂法保湿培养,对分离获得的真菌进行显微形态特征的观察、分类鉴定,根据Ainsworth分类系统进行分类鉴定^[8],鉴定到属。

1.2.2 发酵条件及多糖的提取、纯化与鉴定 取活化后的菌株,接入装有200 ml的液体发酵培养基的500 ml的三角瓶中,37℃振荡培养3 d,即得菌株发酵液,其黏度的测定用NDJ-79型旋转式黏度计进行,多糖含量测定采用苯酚硫酸法测定^[9],另取200 ml发酵液,8 000 r/min离心,取上清液加一倍体积95%乙醇沉淀出多糖,然后用甲醇和乙醚分别进行脱色,并进行真空干燥,获多糖粗品。将其用去离子水配成0.4%的溶液,8 000 r/min离心20 min,取上清液并加入氯仿-异丙醇(5:1, v/v),离心去沉淀,上清液用去离子水透析48 h后进行真空干燥,得白色纯化样品^[10]。

取10 mg纯化多糖样品加入装有1 mol/L硫酸2 ml试管中,100℃下封管水解15 h,水解液以氢氧化钡中和,过滤,滤液点样进行薄层层析分析,层析点间距1.0 cm,以D-半乳糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖、D-甘露糖为参照,用正丁醇:乙酸乙酯:乙丙醇:醋酸:水:吡啶(体积比7:20:12:7:6:6)为展开剂,室温展开15 cm左右,烘干后用苯胺-二苯胺-磷酸试剂喷雾后于85℃烘烤10 min显色^[11-12]。

1.2.3 保水试验 取已知烘干恒重的培养皿45个,每个装入50 g沙子。试验组分A、B两组:A组15个,每个表面喷洒10 ml菌剂;B组15个,每个表面喷洒10 ml多糖提取液;对照组15个,每个表面喷洒10 ml的自来水,置于28℃的恒温条件下,以后每隔24 h从两试验组和对照组中各取出3皿,采用烘干法^[13]测定沙子的含水量。

1.2.4 结皮试验 配置液体PDA培养基1 000 ml,平均分装于6个500 ml的三角瓶中,115℃灭菌30 min。将已长满平板的待测菌种,用直径为6 mm的打孔器打孔,取6块菌饼接种于PDA液体培养基中,28℃,180 r/min摇床振荡培养12 h。然后将发酵液倒入已经铺好沙粒的容器中,每个容器均装300 g沙子,倒入200 ml菌剂,置于室外自然环境中培养观察。此过程用不接菌PDA液体培养基和不结皮

的苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)作为对照,进行结皮试验。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选与鉴定

2.1.1 培养特征 该菌在PDA平板上28℃培养7 d,菌落絮状,不隆起,铺展,具同心圆环。表面气生菌丝疏松、发达,呈细绒絮状。菌落中央为橄榄绿色,边缘呈白色,具水珠,背面为橘红色并产生水溶性红色色素(见图1)。

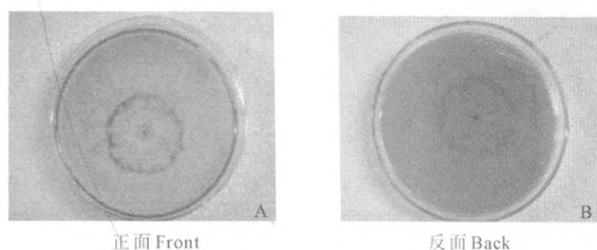


图1 菌落特征

Fig.1 The colony morphology of strain

2.1.2 形态特征 菌丝暗褐色,有隔膜,分枝,不发达(见图2),分生孢子梗顶部有一膨大体,自其上生出产孢细胞,孢子串生,形如葡萄串状(见图3),分生孢子卵圆形,发出绿色荧光(见图4)。

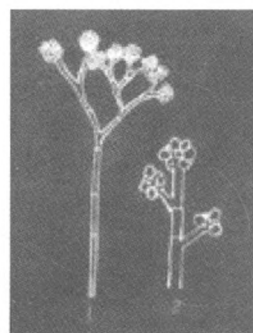


图2 有隔菌丝形态(×400)

Fig.2 The morphology hypha with dolipore

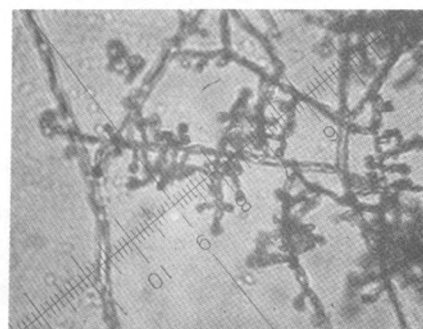


图3 分生孢子梗形态(×400)

Fig.3 Morphology of conidiophore

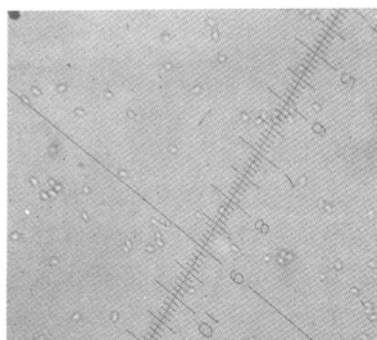
图 4 分生孢子形态 ($\times 400$)

Fig.4 Morphology of conidia

2.1.3 菌株的鉴定 使用光学显微镜观察孢子形态、产孢结构、菌丝颜色及有无横隔等显微特征,对

该菌株鉴定到属。菌丝匍匐,灰色,孢梗细长,稍有色,不规则地成树形,分枝,有时近顶部二叉状,顶端细胞膨大成球形,上生短梗,梗上又形成分生孢子簇,孢子聚集成葡萄穗状,无色或灰色,单胞,卵圆形,通常产生黑的不规则的菌核。鉴定为葡萄孢属 (*Botrytis*)。

2.2 胞外多糖的鉴定

2.2.1 胞外多糖的性质鉴定 室内摇瓶振荡培养 3 d 黏度可达 $9\,860\text{ mPa}\cdot\text{s}$,该真菌的产糖率为 19.246 g/L (干重)。将提取出的胞外多糖配成 1 g/L 的溶液,用 Fehling 试剂进行显色反应,结果有砖红色沉淀生成,表明该菌体所产生的胞外代谢产物中存在还原性糖。在 $200\sim 400\text{ nm}$ 进行紫外光谱扫描,结果发现在 210 nm 左右具有强吸收峰(见图 5)。



图 5 紫外扫描图片

Fig.5 The imagine of ultraviolet scanning

2.2.2 薄层层析 薄层层析结果如图 6,由图可以看出,待测样品 R_f 值与 2 号、7 号较为接近,也就是说组成多糖的单糖主要由 D-甘露糖和 D-半乳糖组成。甘露糖多以游离状态存在于某些植物果皮中,如象牙棕榈子、酵母、红藻、血清球蛋白、卵类粘蛋白和结核杆菌中含有 D-甘露糖的聚糖。半乳糖在植物界常以多糖形式存在于多种植物胶中,具有很强的粘合力。例如红藻中的 K-卡拉胶就是 D-半乳糖和 3,6-内醚-D-半乳糖组成的多糖。由此可见这两种糖对沙粒间的粘合与固定有着非常重要的作用。

2.3 保水实验效果

由图 5 和表 1 可知,随着时间的延长试验组 A 与试验组 B、对照组之间的差异越来越显著,而试验组 B 和对照组之间的差异则不显著;对第五天含水量进行方差分析,由表 1 可见试验组 A 与试验组 B、对照组之间达到极显著。可见,喷洒菌液保水试验

效果最好。

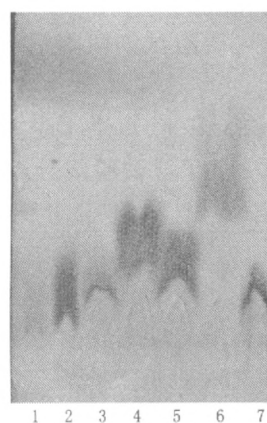


图 6 TLC 结果

Fig.6 The result of TLC

注:1. 待测样品; 2. D-甘露糖; 3. D-葡萄糖; 4. D-木糖; 5. L-阿拉伯糖; 6. L-鼠李糖; 7. D-半乳糖

Note: 1. Tested sample; 2. D-mannose; 3. D-glucose; 4. D-xylose; 5. D-arabinose; 6. D-rhamnose; 7. D-galactose

表 1 保水实验与分析结果

Table 1 The result and analysis of preserving water experiment

项目 Items	第五天含水量平均值(g) The average water content of fifth day	X_{III}	X_{II}
试验组 A(X_I) Treatment group A(X_I)	0.671	$X_I - X_{III} = 0.661^{**}$	$X_I - X_{II} = 0.641^{**}$
试验组 B(X_{II}) Treatment group B(X_{II})	0.030	$X_{II} - X_{III} = 0.02$	
对照组(X_{III}) Control group(X_{III})	0.010		

注：当 $\alpha = 0.05$ 时, $R_2 = 0.0346$, $R_3 = 0.0358$; 当 $\alpha = 0.01$ 时, $R_2 = 0.0524$, $R_3 = 0.0551$; “*” 和 “**” 表示差异性显著水平, 其中 “*” 表示差异显著 ($P < 0.05$); “**” 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: $\alpha = 0.05$, $R_2 = 0.0346$, $R_3 = 0.0358$; $\alpha = 0.01$, $R_2 = 0.0524$, $R_3 = 0.0551$. “*” and “**” denotes e significance level, “*” denotes significant difference ($P < 0.05$); “**” denotes extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.4 结皮试验效果

结皮试验效果如图 7 所示, 可以看出 5 天后, 试验组沙粒表面形成一层结皮, 表面形成了约 8.2 mm 厚的结皮层, 其后期其周边翘起, 中部坚硬 (图 8A), 而不接菌的 PDA 液体培养基和不结皮的苹果炭疽病菌对照组在试验前后无明显变化, 也没有形成任何结皮, 且表面沙粒稀松、易脱落 (图 8B)。将结皮置于显微镜下观察, 结皮层由该株真菌的菌丝体、胞外黏性物质和沙粒形成网状的混合结构, 可见结皮主要由该菌菌丝体、胞外多糖和沙粒组成, 同时, 大量的菌丝所组成的菌丝体本身对沙粒就具有很大的缠绕和包埋作用, 这在提高固沙、防沙的效果方面, 比仅仅依靠黏性物质的黏着作用, 更具有应用前景。

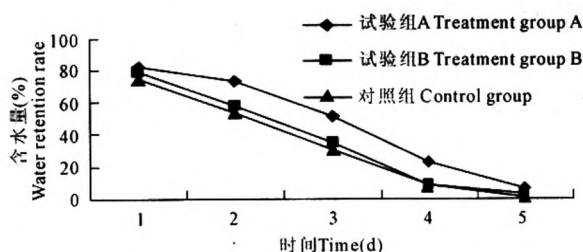


图 7 试验组与对照组保水试验效果比较

Fig.7 Comparison of water retention effect between treatment and control

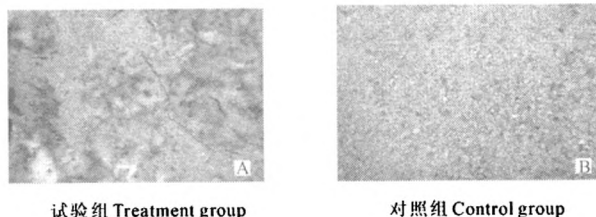


图 8 结皮试验效果

Fig.8 The effect of crust experiment

3 讨论与结论

3.1 讨论

微生物结皮广泛分布于干旱半干旱地区, 与生

态环境是一个相互作用的整体, 对植被恢复与重建具有重要的生态学意义。国内外对微生物结皮在各生态过程中的作用已作了大量研究^[14], 在其对蒸发过程的影响方面也有越来越多的报道^[14], 但依然存在很大争议, 仅就结皮层对蒸发的影响都未达成一致观点^[15]。Johansen^[16]和 Belnap 等人^[17]认为微生物结皮颜色较深可导致蒸发的增加; West 认为^[18], 类似海绵的微生物结皮能较长时间的把水分维持在地表上, 提高了水被蒸发掉的可能性; 也有学者认为, 微生物结皮封闭了土壤表面, 降低了蒸发^[19]。本研究通过大量保水试验证实微生物结皮对水分的流失确有一定保护作用, 微生物结皮还有效地提高了土壤水分含量, 使得土壤能够保持更长时间的湿润状态, 此结果与 West^[18]的一致, 并且表明菌液的保水作用最好, 其次为多糖提取液, 最后为水。然而在此过程中我们只考虑到菌液的作用, 没有考虑到空气干湿度以及环境中其它因素对保水试验的影响^[20], 这些还有待于进一步深入研究。

本研究的结果同时还证实了在初始 pH 值达 7.5 时该真菌生长更好, 这表明 pH 对其生长影响最大, 而沙漠的偏碱性环境则更适合该真菌所需的生长条件。在室外结皮试验中我们也发现将该真菌与周围环境中的植物、微生物等其它生物共培养, 更有利于形成更厚的结皮。究其原因可能是微生物、短命植物和种类丰富的地衣、苔藓和藻类植物间形成了一个良好的共生关系, 再加之该菌这种固有分泌胞外粘多糖的特性, 使其整体形成了一个良好的微生态系统, 微生物是生物土壤结皮的先锋物种, 也是生物土壤结皮演替早期阶段的优势成分, 可为植物提供一定的物质基础促进其生长发育。生物结皮田间试验证明在其它短命植物和种类丰富的地衣、苔藓和藻类植物的共同作用下, 形成的结皮厚度越大, 效果越好, 可见该菌的生长需要周围其它生物如地衣、苔藓和藻类植物等提供营养物质, 这就使该菌更能适应陕北地区的土壤结构和地表机制, 进而起到

保水、固沙的作用。关于结皮微生物群落组成、与其它结皮植物间的互作关系以及结皮影响地表蒸发的机理还有待于做进一步的深入研究。

3.2 结 论

从陕北毛乌素沙地中筛选得到一株真菌,经初步鉴定,属于葡萄孢属(*Botrytis*)。它能在生长繁殖过程中分泌出大量胞外粘多糖,产量达 19.246 g/L,室内摇瓶振荡培养 3 d 黏度可达 9 860 mPa·s。通过结皮试验,表明该株真菌菌剂喷洒于沙粒表面,在沙粒表面形成了约 8.2 mm 厚的一层具有粘结沙粒、保持水分的生物结皮;对第五天沙粒含水量统计分析表明,具有明显的保水作用;对多糖的组分进行了测定,表明该多糖组分主要由 D-甘露糖和 D-半乳糖组成。

参 考 文 献:

- [1] Metting B. Biological surface features of semiarid lands and deserts [C]//Skujins J. Semiarid Lands and Deserts: Soil Resource and Reclamation. New York: Marcel Dekker, 1991:257-293.
- [2] West N E. Structure and function of microphytic soil crusts in wild land ecosystem of arid and semi-arid regions[J]. Advances in Ecological Research, 1990,20:179-223.
- [3] Chartres C J. Soil crusting in Australia[C]//Sumner M E, Stewarts B A. Soil Crusting: Chemical and Physical Processes. Boca Raton, Florida: Lew Publishers, 1992:339-365.
- [4] Gupta V S R, Germida J. Distribution of microbial biomass and its activity in soil aggregate size classes as affected by cultivation[J]. Soil Biochem, 1988,20:777-786.
- [5] Lynch J M. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure[J]. Plant Soil, 1984,76:307-318.
- [6] 贺韵雅,于海峰,逢圣慧.生物土壤结皮的生物学功能及其修复研究[J].地球与环境,2011,39(1):91-95.
- [7] 周德庆.微生物实验教程[M].北京:高等教育出版社,2006.372.
- [8] 张中义.中国真菌志[M].北京:科学出版社,2006:24-26.
- [9] 邓成华,杨祥良,顾小曼,等.虎奶菌多糖的分离纯化及成分分析[J].中国药学杂志,2000,35(5):296-298.
- [10] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生化实验方法与技术[M].北京:高等教育出版社,1997:5-6.
- [11] 陈有为,李绍兰,黄浩海,等.半知菌曲霉族真菌胞外多糖的研究 I.青霉胞外多糖的分离筛选[J].微生物学杂志,2002,22(2):7-9.
- [12] 孙玉军,陈彦,王洵,等.蜜环菌胞外多糖的分离纯化及其性质研究[J].安徽大学学报(自然科学版),2005,29(5):90-94.
- [13] 潘惠霞,程争鸣,张元明,等.寡营养细菌及其固沙作用的研究[J].中国沙漠,2007,27(3):127-131.
- [14] Serpe M D, Orm J M, Barks T, et al. Germination and seed water status of four grasses on moss-dominated biological soil crusts from arid lands[J]. Plant Ecology, 2006,185:163-178.
- [15] 刘立超,李手中,宋耀选,等.沙坡头人工植被区微生物结皮对地表蒸发影响的试验研究[J].中国沙漠,2005,25(2):191-195.
- [16] Johansen J R. Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America[J]. Journal of Phycology, 1993,29:14-147.
- [17] Belnap J, Lange O L. Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management[M]. Heidelberg: Springer, 2003:3-371.
- [18] West N E. Structure and function of microphytic soil crusts in wild-land ecosystems of arid to semi-arid regions[J]. Advances in Ecological Research, 1990,20:179-223.
- [19] Brotherson J D, Rushforth S R. Influence of cryptogamic crusts on moisture relationships of soils in Navajo National Monument[J]. Arizona Great Basin Nat, 1983,43:73-78.
- [20] 周丽芳,阿拉木萨.微生物结皮层对地表蒸发过程影响的机理研究[J].水土保持学报,2010,24(1):209-213.

A fungus strain of *Botrytis* and its crust effect

DENG Zhen-shang¹, ZHAO Jia-fu^{1,2}, LEI-Chao¹, LI Jun³, WEI Ge-hong⁴

(1. The Life-science Department of Yanan University, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Guiyang,

Guizhou 550025, China; 3. Yan'an Institute of Microbiology, Yan'an, Shaanxi 716000, China;

4. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A fungus strain was isolated from the underlayer of biological crusts in Maowusu desert. According to the analysis of morphology, this strain was identified as *Botrytis*. It could secrete the massive mucopolysaccharide during the growth, the viscosity reached 9 860 mPa·s, and the yield of mucopolysaccharide reached 19.246 g/L, after having been cultivated for 3d in liquid shake flask. Moreover, the components of polysaccharide were assayed by use of TLC. The results showed that mucopolysaccharide released by this fungus consisted of the D-mannose and D-galactose. If a fungal culturing solution was sprinkled on shifting sand surface, a microbiotic crust of 8.2 mm conglomerating sand could be formed. The crust can not only stabilize moving sand but also can slower the rate of soil moisture evaporation. These show its great application potential in desertification control, restoration and protection of the ecological environment.

Keywords: Fungus; exopolysaccharides; microbiotic crust; water retention