

张 新,肖亚静,于春生,等. 桃色顶孢霉代谢物对绿豆田土壤酶及微生物的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):163-165.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.050

# 桃色顶孢霉代谢物对绿豆田土壤酶及微生物的影响

张 新,肖亚静,于春生,林志伟,台莲梅,左豫虎,孙冬梅,于立河

(黑龙江八一农垦大学,黑龙江大庆 163319)

**摘要:**以绿豆花期根际土壤为研究对象,分析顶孢霉代谢物不同处理后土壤微生物量、土壤酶活性的变化特征及其相互关系。结果表明:顶孢霉代谢物的处理均可以提高土壤中放线菌的比例,降低真菌的比例;对绿豆花期根际土壤磷酸酶、多酚氧化酶的测定发现,施用桃色顶孢霉发酵液浸种会提高二者的酶活性,但对土壤过氧化氢酶、蔗糖酶的影响却相反,会降低其活性。由结果可知,绿豆花期根际微生物量、土壤酶活性明显受到霜霉菌、桃色顶孢霉发酵液的影响,为该菌株的进一步应用提供了理论依据。

**关键词:**绿豆;根际土壤微生物;土壤酶活性;桃色顶孢霉发酵液

**中图分类号:** Q939.9;S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0163-03

绿豆是我国主要的食用豆类作物,在多个地区都有种植。随着绿豆种植面积的逐年加大,绿豆的病害也逐渐增加,其中霜霉病就是一种重要的绿豆植物病害<sup>[1]</sup>。土壤是霜霉病菌的习居场所与传播途径,而且土传病害的发生造成了土壤环境的改变。土壤微生物是土壤有机复合体的重要组成部分,参与土壤生态系统物质与能量的循环,对植物的生长影响很大,是土壤肥力评价的重要指标。土壤酶参与土壤中许多重要的生物化学过程和物质循环,可以客观地反映土壤的肥力状况,是影响土壤生物学肥力的重要因素<sup>[2]</sup>。

目前国内外对绿豆霜霉病的研究较少,鉴于人们对绿色食品的需求,以及生物农药对环境良好的兼容性,本试验以实验室分离获得的广谱、高效的拮抗真菌——桃色顶孢霉<sup>[3]</sup>代谢产物为生物农药对绿豆霜霉病进行防治。由于绿豆花期是绿豆生长发育过程一个重要的阶段,本试验通过分析经过桃色顶孢霉发酵液处理后绿豆花期根际土壤微生物数量和酶活性的变化,明确桃色顶孢霉代谢物对绿豆霜霉病的作用,为在生产实践中用生物防治手段治理绿豆霜霉病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

绿豆品种为密荚王,由黑龙江八一农垦大学农学院栽培实验室提供,种子采用常用方法筛选消毒后供试。

菌种为桃色顶孢霉(*Acremonium persicinum*),由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物实验室分离。霜霉菌由黑龙江八一农垦大学农学院植物保护实验室提供。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 顶孢霉发酵蛋白粗提物及霜霉土的制备

取活化的

收稿日期:2015-06-05

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2014BAD07B05-H08);“国家杂粮工程技术研究中心”组建项目(编号:2011FU125X07)。

作者简介:张 新(1990—),男,黑龙江牡丹江人,硕士研究生,主要从事应用微生物的研究。E-mail:272318207@qq.com。

通信作者:孙冬梅,博士,教授,主要从事微生物资源与开发研究。

E-mail:sdmlzw@126.com。

顶孢霉菌种接种于查氏培养基中,恒温摇床中于 28 ℃、160 r/min 振荡培养 7 d;过滤上清液;按溶液量加入硫酸铵至 20%,离心去除沉淀物;继续加入硫酸铵至 80%,离心后取沉淀物,重蒸馏水中透析 24 h;冷冻干燥至恒质量;用蒸馏水按 1:1 000 稀释后备用。

将土壤干热灭菌,分为 5 份,加入绿豆霜霉病病叶,混匀制成霜霉土。

1.2.2 绿豆种子处理 本试验分为 4 个处理。处理 1:水浸种;处理 2:水浸种 + 喷无菌水 + 霜霉土;处理 3:顶孢霉发酵液浸种 + 霜霉土;处理 4:水浸种 + 喷顶孢霉发酵液 + 霜霉土。每个处理重复 3 次,每次重复 1 盆,每盆播种 25 粒处于萌动状态的绿豆种子。试验期间,不同处理盆栽的管理一致。播种后每隔 2 d 浇水 1 次,每次每盆浇水量相同。

1.2.3 土壤中酶活性测定 在每个处理中取 10 g 土样风干,土壤脲酶采用比色法测定;磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法测定;过氧化氢酶采用  $\text{KMnO}_4$  滴定法<sup>[4]</sup>测定;蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法<sup>[5-6]</sup>测定;超氧化物歧化酶采用氮蓝四唑比色法测定;多酚氧化酶采用邻苯三酚比色法<sup>[5-9]</sup>测定。

1.2.4 土壤中微生物数量测定 土壤中微生物数量测定采用稀释平板法<sup>[4,10-11]</sup>,所测的微生物种类包括细菌、真菌、放线菌<sup>[12]</sup>。

### 1.3 数据处理与分析

所得数据以干土表示,均为 3 次重复取平均值,采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件处理数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 桃色顶孢霉代谢物对绿豆花期根际土壤微生物量的影响

不同处理中绿豆花期根际微生物的组成及数量存在显著差异( $P < 0.05$ ),不同处理导致绿豆花期的根际微生物数量不同(表 1)。4 种处理土壤中细菌数量均最多,其次是放线菌,真菌最少。细菌数量占比在 4 种不同处理下的分布特征:处理 1 > 处理 2 > 处理 3 > 处理 4,并且处理 3 与处理 1、处理

2 存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。放线菌数量在 4 种不同处理下的分布特征:处理 2 > 处理 4 > 处理 1 > 处理 3,并且这 4 种不同的处理间都存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。真菌数量在处理 1

中最多,在处理 4 中分布最少。经发酵液处理均提高放线菌生物数量比例,降低真菌生物数量比例及总数。

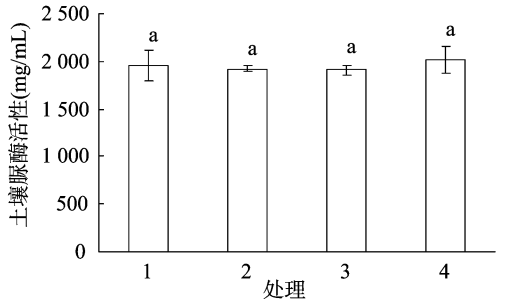
表 1 不同处理对根际土壤微生物数量的影响

处理	总数 ( $\times 10^6$ CFU/g)	细菌		放线菌		真菌	
		数量( $\times 10^6$ CFU/g)	占比(%)	数量( $\times 10^4$ CFU/g)	占比(%)	数量( $\times 10^3$ CFU/g)	占比(%)
1	12.50	12.00 $\pm$ 3.21a	96.00	45.33 $\pm$ 4.18c	3.6	46.33 $\pm$ 2.03a	0.371
2	15.84	15.00 $\pm$ 4.93a	94.70	83.00 $\pm$ 4.58a	5.2	7.00 $\pm$ 1.00b	0.044
3	3.59	3.33 $\pm$ 0.33b	92.76	25.33 $\pm$ 3.18d	7.1	2.00 $\pm$ 0.58c	0.056
4	6.22	5.57 $\pm$ 0.33ab	89.55	64.00 $\pm$ 6.80b	10.3	1.13 $\pm$ 0.33c	0.018

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2 桃色顶孢霉代谢物对绿豆花期根际土壤相关酶活性的影响

2.2.1 不同处理对土壤中脲酶活性的影响 脲酶是土壤酶中能酶促有机物分子中的酶键水解,并具有极强专一性水解作用的酶,能够将施入土中的尿素水解成氨和碳酸,是植物氮源之一<sup>[13-14]</sup>。由图 1 可知,不同处理土壤脲酶活性的变化趋势相似,且差异不显著,说明经过不同的处理对土壤脲酶的活性影响并不大。



处理上方不同英文字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下图同  
图1 不同处理对土壤脲酶的影响

2.2.2 不同处理对土壤中磷酸酶活性的影响 土壤磷酸酶的酶促作用能够加快有机磷的脱磷速度。土壤有机磷的转化受多种因子制约,磷酸酶的积累对提高土壤磷素的有效性具有重要作用。土壤磷酸酶活性的高低可以反映土壤速效磷的供应状况,磷酸酶活性是评价土壤磷元素生物转化方向与强度的指标<sup>[6]</sup>。通过顶孢霉发酵液浸种使土壤磷酸酶活性明显增强(图 2),处理 3 和其他 3 种处理差异显著 ( $P < 0.05$ );处理 4 和其他 3 种处理相比,磷酸酶活性降低且差异显著。

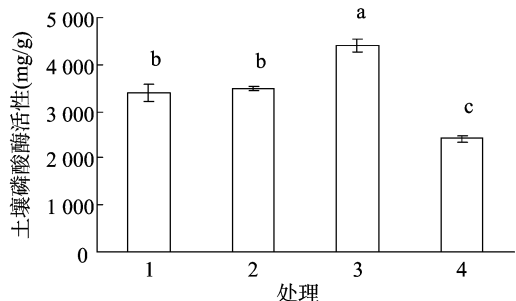


图2 不同处理对土壤磷酸酶活性的影响

2.2.3 不同处理对土壤中过氧化氢酶活性的影响 过氧化氢酶广泛存在于土壤和生物体中,土壤中的过氧化氢酶能够酶促过氧化氢的分解,有利于防止对活细胞的毒害作用。过

氧化氢酶不仅与土壤微生物量有关,而且还与土壤有机质的转化有密切的关系。由图 3 可知,处理 2 的土壤过氧化氢酶活性最高,并且此处理与其他处理差异显著 ( $P < 0.05$ ),说明土壤施入霜霉土后土壤中积累了大量的过氧化氢,当绿豆生长到花期时,土壤中过氧化氢酶的活性增强,从而解除旺盛生长积累的过氧化氢等有毒物质对绿豆等植物产生的毒害作用;而处理 3、处理 4 与处理 1 相比土壤过氧化氢酶活性是有所降低的,说明桃色顶孢霉发酵液代谢物对霜霉病原菌具有抑制作用。

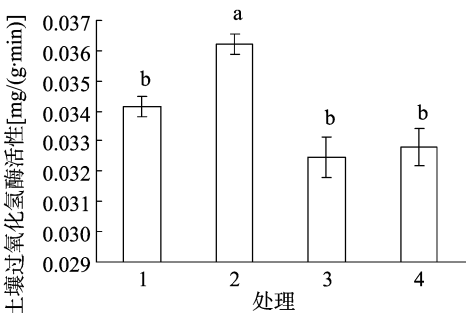


图3 不同处理对土壤过氧化氢酶的影响

2.2.4 不同处理对土壤中蔗糖酶活性的影响 蔗糖酶是一种可以把土壤中高分子量的蔗糖分子分解成能够被植物和土壤微生物吸收利用的葡萄糖、果糖的一种酶,它的活性强弱反映了土壤熟化程度和肥力水平,是土壤中碳转化与呼吸强度的重要指标之一,对增加土壤中易溶性营养物质起到重要作用。由图 4 可知,处理 2、处理 3、处理 4 与处理 1 相比蔗糖酶活性下降,且存在显著差异 ( $P < 0.05$ ),说明添加霜霉病菌的处理导致土壤蔗糖酶活性降低。

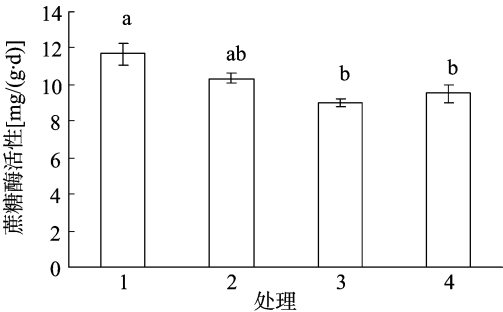


图4 不同处理对土壤蔗糖酶的影响

2.2.5 不同处理对土壤中多酚氧化酶活性的影响 土壤多酚氧化酶主要来源于土壤微生物、植物根系分泌物以及动植

物残体分解释放的酶。多酚氧化酶是一种复合性酶,能够把土壤中芳香族化合物氧化成醌,醌与土壤中的蛋白质、氨基酸、糖类、矿物等物质反应生成分子量不等的有机质和色素,完成土壤芳香族化合物循环,通过土壤多酚氧化酶的反应机制能够使土壤环境得到修复<sup>[15-16]</sup>。由图 5 可知,处理 3、处理 4 与处理 1、处理 2 相比土壤多酚氧化酶的活性差异显著( $P < 0.05$ ),说明使用顶孢霉发酵液后会使土壤多酚氧化酶的活性大大提高,使土壤环境得到及时的修复;与处理 1 相比,处理 2 的酚氧化酶活性降低,且差异显著( $P < 0.05$ ),说明施用霜霉病原菌会使土壤环境遭到破坏。

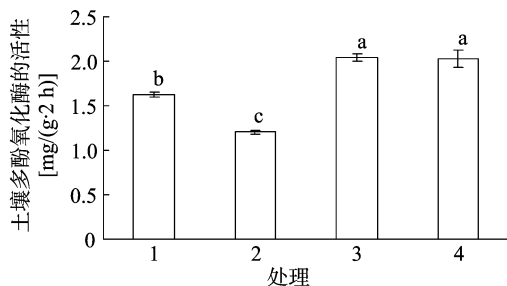


图5 不同处理对土壤多酚氧化酶的影响

### 3 结论与讨论

土壤微生物是土壤生态体系的重要组成部分<sup>[17-18]</sup>,它参与土壤养分转化、物质代谢、有机物分解、污染物降解等多种生化反应<sup>[19]</sup>,通过这些生化反应过程促进土壤养分平衡供应,提供植物生长所需要的营养物质,同时发挥对土壤中有效态养分储备的库和源作用<sup>[20]</sup>。土壤微生物和土壤酶是衡量土壤肥力和养分转化的重要指标<sup>[21]</sup>。一般情况下,土壤中细菌种类最多,其次为放线菌,再次为真菌。随着土壤环境的变化,微生物的这种结构比例会发生一定的变化<sup>[22]</sup>。从试验结果可以看出,各个处理的土壤真菌、细菌和放线菌的比例不同,其中细菌数量占绝对优势,真菌最少。本试验中,土壤根际细菌、真菌、放线菌的微生物总量表现为处理 2 > 处理 1 > 处理 4 > 处理 3,喷施顶孢霉发酵液后在一定程度上降低了根际土壤微生物的总量,但却提高了放线菌的比例,降低了真菌比例,这可能与放线菌为主要拮抗微生物有关<sup>[21]</sup>。土壤酶是一类较为稳定的蛋白质,与土壤成分结合牢固,可以长期积累,因此土壤酶表现出一定的稳定性。同时,土壤酶是土壤生态系统代谢的一类重要动力,土壤中所进行的生化反应都是在酶的催化下完成的。许多研究表明,土壤酶活性与土壤质量密切相关,其催化作用对土壤中元素的循环和迁移有重要的作用<sup>[9]</sup>。近年来许多研究都揭示了土壤酶活性和土壤肥力之间的关系,认为酶活性可以作为衡量和评价土壤肥力的指标之一。而不同处理对绿豆花期根际土壤蔗糖酶的影响表现为施用霜霉病原菌会降低土壤酶活性,使土壤的肥力水平逐渐降低。处理 2 对绿豆花期根际土壤中过氧化氢酶活性有提高的趋势,表明为防止对绿豆植株的毒害作用,土壤氧化过程增强。不同的处理对绿豆花期根际土壤磷酸酶、多酚氧化酶的影响表现为施用桃色顶孢霉发酵液浸种会提高它们的酶活性,且与其他处理存在显著差异( $P < 0.05$ ),即可提高对土壤环境的修复作用。

### 参考文献:

- [1] 李宝燕,王英姿,刘学卿,等. 3 种杀菌剂对葡萄霜霉病菌的毒力测定和田间药效试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):98-99.
- [2] 张亮,程智慧,周艳丽,等. 百合生育期根际土壤微生物和酶活性的变化[J]. 园艺学报,2008,35(7):1031-1038.
- [3] 张雨竹,董雪梅,郭春兰,等. 桃色顶孢霉发酵液对大豆的促生及对抗氧化酶活性的影响[J]. 中国油料作物学报,2014,36(4):519-523.
- [4] 李正,刘国顺,敬海霞,等. 翻压绿肥对植烟土壤微生物量及酶活性的影响[J]. 草业学报,2011,20(3):225-232.
- [5] 郝建朝,吴沿友,连宾,等. 土壤多酚氧化酶性质研究及意义[J]. 土壤通报,2006,37(3):470-474.
- [6] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986:14-19.
- [7] Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste water and soil treatment: a review[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2000, 28: 83-99.
- [8] Insam H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s[J]. Geoderma, 2001, 100(3):389-402.
- [9] Diamantidis G, Effosse A, Potier P, et al. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(7):919-927.
- [10] 秦璐,吕光辉,何学敏. 艾比湖地区冻融作用对土壤微生物数量和群落结构的影响[J]. 冰川冻土,2013,35(6):1590-1599.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社,1980:50-100.
- [12] 杨敬天,胡进耀,张涛,等. 珙桐土壤微生物数量及其与土壤因子的关系[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):278-281.
- [13] 邱现奎,董元杰,万勇善,等. 不同施肥处理对土壤养分含量及土壤酶活性的影响[J]. 土壤,2010,42(2):249-255.
- [14] 王冬梅,王春枝,韩晓日,等. 长期施肥对棕壤主要酶活性的影响[J]. 土壤通报,2006,37(2):263-267.
- [15] 张咏梅,周国逸,吴宁. 土壤酶学的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2004,12(1):83-90.
- [16] 徐鸿斌,王绍明,蒋静,等. 新疆栽培红花根际土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记多样性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):364-368,441.
- [17] 陈伟. 苹果园土壤微生物类群与栽培环境关系的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [18] 俞明正,戴濡伊,吴季荣,等. 转 *TaDREB4* 基因抗旱小麦对其根际土壤速效养分、酶活性及微生物群落多样性的影响[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):938-945.
- [19] 赵海涛,李良俊,殷朝珍,等. 水生蔬菜轮作对大棚草莓连作土壤性质的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(2):289-295.
- [20] Xiao Y B, Li L, Zhang F S. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and fababean using direct and indirect <sup>15</sup>N techniques[J]. Plant and Soil, 2004, 262(1/2):45-54.
- [21] 刘峰,温学森. 根系分泌物与根际微生物关系的研究进展[J]. 食品与药品,2006,8(10):37-40.
- [22] Govaerts B, Mezzalama M, Unno Y, et al. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity[J]. Applied Soil Ecology, 2007, 37(1/2):18-30.