

王巧玲,范广璞,杨 猛,等. 复合微生物肥料功能菌的筛选及其对黄瓜幼苗的促生作用[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):146-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.038

复合微生物肥料功能菌的筛选 及其对黄瓜幼苗的促生作用

王巧玲, 范广璞, 杨 猛, 许楠楠

(江苏食品药品职业技术学院, 江苏淮安 223003)

摘要:为了筛选出分别具有固氮、解有机磷、解有机氯功能的菌株,并利用它们其生产复合微生物肥料,从供试土壤分离出目的菌株,测定其代谢能力,对其进行生理生化和分子鉴定,并评价其对黄瓜幼苗的促生作用。结果表明,分离得到代谢能力较强的固氮、解有机磷、解有机氯菌株 GN6、JP2、JC1,经生理生化和分子鉴定确定 GN6 属于假单胞菌属(*Pseudomonassp*),JP2、JC1 为芽孢杆菌属(*Bacilluspp*),3 株菌可以同时拮抗 2 种病原菌,且相互之间不发生拮抗。用 GN6、JP2、JC1 菌液分别接种处理黄瓜幼苗,其株高和地上部干质量与对照组相比有显著差异,3 株菌株混合液处理对黄瓜幼苗的促生长作用与对照组和单独处理组相比均有显著差异。筛选出的菌株可以作为复合微生物肥料的功能菌株。

关键词:复合微生物肥料;固氮菌;有机磷农药降解菌;有机氯农药降解菌;黄瓜幼苗

中图分类号: S144.1;S642.206 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0146-04

近年来,全世界农药化肥使用量的不断增加,造成了土壤板结、河流和地下水污染等一系列问题。我国作为农业大国,对农药、化肥的依赖性较强,在使用农药防治病虫害的同时,常产生粮食、蔬菜等农产品中农药残留超标的问题,且多数农药不易被生物降解,对人类及其他生物产生毒害。大量研究表明,微生物肥料的开发与应用对创造良好的生态环境、改善土壤结构、提高土壤肥力及减少农药污染等具有重要作用,是农药和化肥的有效替代品^[1]。

微生物肥料是指一种以活性微生物为主的特定菌剂,能够通过微生物的生命活动,产生农作物所需的特定肥料,并促进土壤中的物质转化,刺激和调控作物的生长,防治作物的病虫害,降解农药,从而达到植物增产、减轻化学污染的目的^[2]。微生物肥料的核心是微生物,具有微生物的特性,其降解农药的机制主要分为 2 种:一种是通过酶促反应直接降解农药;另一种是通过改变化学和物理环境间接作用于农药^[3]。目前微生物肥料多采用多种菌株复合的方式充分发挥各菌株的作用,从而提高微生物肥料的效力^[4]。本研究从农药污染的土壤中筛选出具有固氮、解有机磷农药、解有机氯农药的菌株,经鉴定后进行黄瓜幼苗的促生长试验,为实际应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 培养基 LB 培养基^[5]: 蛋白胨 1.00 g,酵母粉 0.50 g,NaCl 1.00 g,H₂O 100 mL,(固体)琼脂 15 g/L。Ashby 无氮

培养基^[6]: KH₂PO₄ 0.03 g, CaCO₃ 0.50 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.03 g,甘露醇 1.00 g,NaCl 0.30 g,(固体)琼脂 1.50 g,CaSO₄ 0.01 g,去离子水 100 mL。液体选择培养基:普通 LB 培养基灭菌后冷却至 50 ℃,加入 1 g/L 有机磷农药或 1 g/L 有机氯农药。固体选择培养基:普通 LB 固体培养基灭菌后冷却至 50 ℃,加入 1 g/L 有机磷农药或 1 g/L 有机氯农药。

1.1.2 试剂 氧乐果、2,4-D,均购自江苏扬农化工集团有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 样本采集 采样地点为江苏省苏北地区某农药生产企业周边农田。采样方法:取地表及地表下 5~10 cm 处的土样 1 kg 左右,装于预先灭菌的袋子中,扎紧。

1.2.2 土壤悬液的制备 称取 10 g 土壤样本溶于 90 mL 无菌水中,充分振荡,将土壤悬液按 10 倍梯度逐步稀释,制成 10⁻¹~10⁻⁷ 土壤稀释液。

1.2.3 功能 菌株的初步分离与筛选 取 0.1 mL 10⁻³~10⁻⁷ 土壤稀释液,依次均匀涂布到 Ashby 培养基、有机磷农药培养基、有机氯农药培养基上,30 ℃ 培养 7 d,观察生长情况并选取透明圈较大的单菌落,多次传代培养后取长势较好的菌株保存。

1.2.4 功能菌株的复筛

1.2.4.1 固氮菌株的复筛 采用乙炔还原法^[7]测定固氮菌株的固氮酶活性,筛选出固氮能力较强的菌株。首先将初筛获得的菌株分别接种于 4.5 mL Ashby 无氮培养基中,28 ℃ 培养 48 h 后,从试管中抽出 1.8 mL 气体,然后注入 1.6 mL C₂H₂(对照管除外),再于培养箱中培养 48 h 后,从试管中抽取 0.5 mL 混合气体注入气相色谱仪中,测定 C₂H₂、C₂H₄ 的生成情况。根据 C₂H₄ 峰值判断 C₂H₄ 的产生情况,以接种菌株但未注入 C₂H₂ 的试管作为对照组,重复 5 次。固氮酶活性计算公式如下:

收稿日期:2017-05-16

基金项目:江苏省科技计划(编号:NSG0920007-1)。

作者简介:王巧玲(1990—),女,江苏淮安人,硕士,讲师,主要从事微生物研究。E-mail:wangqiaoling0903@163.com。

$$N = (h_x \times C \times V) / (h_s \times \text{常数} \times t)$$

式中: h_x 为样品峰值; h_s 为标准 C_2H_4 峰值; C 为标准 C_2H_4 浓度, nmol/mL; V 为试管体积, mL;常数为标准 C_2H_4 测试时的体积, mL; t 为样品培养时间, h; N 为产生的 C_2H_4 浓度, 即固氮酶活性, nmol/(h·mL)。

1.2.4.2 有机磷农药降解菌的复筛 将初筛获得的菌株接种至加入有机磷农药的液体选择培养基中, 以不接种菌的空液体选择培养基作为对照, 重复5次, 37℃振荡培养72 h后, 采用分光光度法^[8]分别测定培养前后培养液中有机磷含量, 考察各菌株对有机磷农药的降解能力。有机磷农药降解率计算公式如下:

$$\text{降解率} = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100\%$$

式中: C_1 为培养前有机磷浓度, nmol/mL; C_2 为培养后有机磷浓度, nmol/mL。

1.2.4.3 有机氯农药降解菌的复筛 将初筛获得的菌株接种至溴甲酚紫培养基中, 以不接种菌株的培养液作为对照, 重复5次, 30℃振荡培养, 当培养液由紫色变为黄色时, 停止培养^[9]。将培养液于4 000 r/min离心20 min, 取上清, 采用分光光度法于283 nm处测定吸光度, 并计算有机氯农药的降解率, 通过比较筛选出降解力最强的菌株。有机氯农药降解率计算公式如下:

$$\text{降解率} = (L_1 - L_2) / L_1 \times 100\%$$

式中: L_1 为培养前有机氯浓度, nmol/mL; L_2 为培养后有机氯含量, nmol/mL。

1.2.4.4 拮抗病原菌能力测定 采用平板对峙法^[10]测定菌株与病原菌的拮抗作用。将菌株接种到LB液体培养基中, 于150 r/min振荡培养48 h。再将黄瓜枯萎病病菌、黄瓜褐斑病菌接种到PDA平板中心(病原菌菌饼直径为5~6 mm), 距中心约为3 cm, 滴加菌株悬液, 28℃培养3~5 d。记录病原菌的菌落半径(R)、病原菌点样中心点到被复筛菌株抑制边缘的半径(r), 按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = (R - r) / R \times 100\%$$

1.2.4.5 菌株拮抗性试验 对筛选出的菌株进行拮抗性试验, 将无拮抗反应的菌株进行组合, 作为复合微生物肥料的功能菌株。

1.2.5 菌种鉴定

1.2.5.1 菌株形态特征和生理生化特性 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[11]对筛选所得菌株的菌落特征、菌体形态进行观察, 对菌落的染色性及生理生化特性进行研究, 获得鉴定结果。

1.2.5.2 菌株的分子鉴定 用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒提取出复筛菌株的基因组DNA, 采用PCR扩增16S rDNA的方法对复筛菌株进行分子鉴定。设计的上游引物序列为5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物序列为5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系: 10×Buffer 5 μL, dNTP mix 4 μL, Taq酶0.3 μL, cDNA2 μL, 引物1 μL, ddH₂O 37 μL。PCR扩增条件: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。获得的产物采用PCR产物纯化试剂盒进行纯化, 纯化后的产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行验证, 并送至生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果与序列库进行

比对并构建系统发育树。

1.2.6 盆栽试验 选取颗粒饱满均匀的黄瓜种子, 用蒸馏水洗净并浸泡一段时间后, 用75%乙醇浸泡1 min, 5%次氯酸钠浸泡3 min, 每次浸泡后均用无菌水冲洗5~6次, 进行种子表面消毒。将消毒后的黄瓜种子置于培养皿中, 于暗处催芽2 d。催芽后播种于育苗盘, 待幼苗长出2~3张真叶后, 挑选大小、长势一致的幼苗移入含有有机磷和有机氯农药的灭菌栽培基质的塑料盆中。将供试菌株接种于LB液体培养基中, 于28℃、160 r/min振荡培养至对数期, 将菌悬液用PBS(磷酸缓冲盐溶液)洗涤2~3次后稀释至菌液浓度约为10⁸ CFU/g。分别取稀释后的菌悬液5 mL浇灌于幼苗根部, 每10 d接种1次, 以加入等量无菌水为对照, 每组6次重复。放置于温室中培养30 d后, 将作物整株从盆中取出, 用清水洗净, 吸水纸吸干, 测量各试验组和对照组的各种形态学参数。

1.2.7 数据处理 各组所得计量数据采用均值±标准差的方式表示, 使用统计软件进行统计分析并作图, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 功能菌株的初筛结果

在Ashby培养基、有机磷农药培养基、有机氯农药培养基上均匀涂布土壤稀释液, 于30℃培养7 d后, 根据其长势和透明圈的大小分别挑选出固氮菌株8株(GN1~GN8)、有机磷农药降解菌株8株(JP1~JP8)、有机氯农药降解菌株8株(JL1~JL8)。

2.2 功能菌株的复筛结果

2.2.1 固氮菌株 复筛试验为筛选出固氮能力较强的菌株, 采用乙炔还原法测定初筛获得的菌株的固氮酶活性。图1表明, 8株自生固氮菌的固氮酶活性介于55.41~126.17 nmol/(h·mL), 将固氮菌株按照固氮酶活性的高低进行排序可得: GN4 > GN6 > GN7 > GN5 > GN3 > GN1 > GN2、GN8, 其中GN4、GN6、GN7的固氮酶活性均高于100 nmol/(h·mL), 因此选取GN4、GN6、GN7菌株与病原菌进行拮抗性试验。

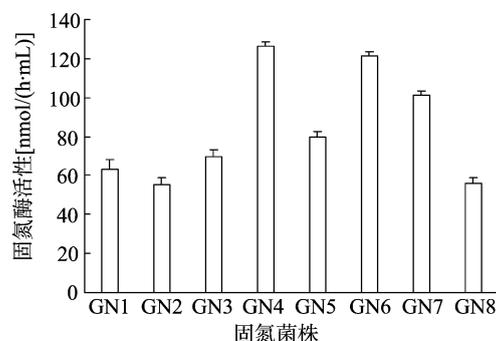
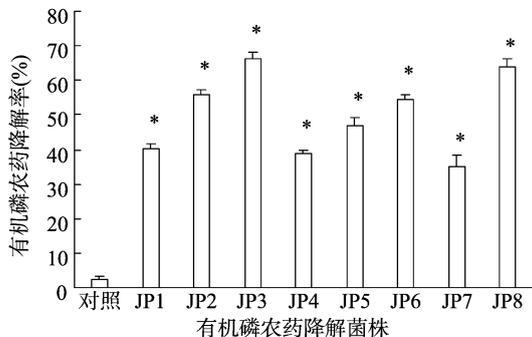


图1 不同固氮菌株的固氮酶活性

2.2.2 有机磷农药降解菌 复筛试验为获得有机磷农药降解率较高的菌株, 将初筛获得的菌株接种至加入有机磷农药的液体选择培养基中进行培养, 采用分光光度法分别测定培养前后培养液中的有机磷含量, 考察各菌株对有机磷农药的降解能力。图2显示, 8株菌株的有机磷农药降解率介于

34.93%~66.18%之间,且与对照组相比有极显著差异($P < 0.01$),其中菌株JP3的有机磷农药降解率最高,为66.18%,JP8、JP2的有机磷农药降解率次之,分别为64.03%、55.94%,因此选取菌株JP3、JP8、JP2与病原菌进行拮抗性试验。



*表示与对照组相比有极显著差异($P < 0.01$)。图3同

图2 有机磷农药降解菌的农药降解率

2.2.3 有机氯农药降解菌 复筛采用分光光度法对初筛的有机氯农药降解菌株的降解率进行测定,结果(图3)表明,8株菌株的有机氯农药降解率介于38.44%~74.86%之间,其中降解率最高的是JC7菌株,为74.86%,其次是JC3、JC1,各组与对照组相比均有极显著差异($P < 0.01$),因此筛选菌株JC7、JC3和JC1进行病原菌拮抗性试验。

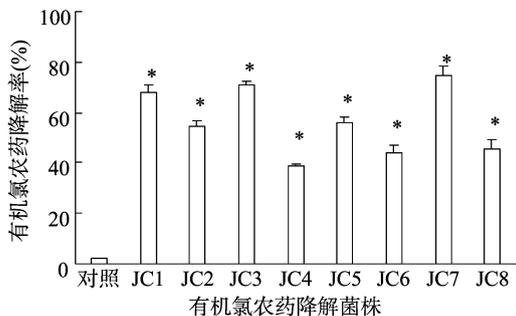


图3 有机氯农药降解菌的农药降解率

2.2.4 病原菌拮抗性测定结果 将筛选出的9株菌株分别与黄瓜枯萎病病菌、黄瓜褐斑病病菌进行拮抗作用试验,由表1可知,对2种病原菌均有抑制能力的菌株为GN6、JP2、JC7、JC1。

表1 各菌株对病原菌的拮抗率

菌株	拮抗率(%)	
	黄瓜枯萎病病菌	黄瓜褐斑病病菌
GN4	41.94 ± 0.21	—
GN6	55.44 ± 0.32	36.83 ± 0.43
GN7	—	—
JP3	—	51.87 ± 0.54
JP8	37.94 ± 0.37	—
JP2	61.21 ± 0.19	40.11 ± 0.21
JC7	39.84 ± 0.31	28.97 ± 0.42
JC3	—	21.33 ± 0.36
JC1	41.88 ± 0.19	19.94 ± 0.27

2.2.5 菌株拮抗性试验 对筛选出的GN6、JP2、JC7、JC1进行菌株间拮抗性试验,发现GN6、JP2、JC1之间无相互拮抗作

用,而JC7和GN6、JP2有拮抗现象,因此最终筛选出GN6、JP2、JC1作为复合微生物肥料的有效菌株。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌株形态特征和生理生化特性测定 通过对3个菌株的菌落形态特征观察发现,GN6、JP2、JC1菌落均为乳白色,边缘不整齐(表2)。显微结构观察显示,3株菌株均为杆状,GN6为革兰氏阴性菌,不产芽孢,JP2和JC1为革兰氏阳性菌,芽孢中生或次端生。生理生化试验结果显示,GN6能发酵葡萄糖、液化明胶、利用甘露醇、吡啶、甲基红试验呈阴性,不能利用柠檬酸,接触酶、氧化酶、过氧化氢酶试验均为阳性。JP2和JC1能发酵葡萄糖、水解淀粉、液化明胶、利用甘露醇和柠檬酸盐,吡啶试验、氧化酶试验为阴性,JC1的V-P试验呈阴性,其他反应均为阳性。

表2 菌株菌落形态特征及部分生理生化特征

项目	GN6	JP2	JC1
菌落特征	乳白色,圆形隆起,湿润光滑,边缘有缺刻	乳白色,不透明,有脐状突出,边缘不整齐,有褶皱	乳白色,圆形,表面粗糙,边缘不规则
形状	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色	-	+	+
芽孢	-	+	+
运动性	+	+	+
葡萄糖	+	+	+
淀粉水解	-	+	+
明胶水解	+	+	+
吡啶试验	-	-	-
V-P试验	+	+	-
甲基红	-	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
柠檬酸盐	-	+	+
甘露醇	+	+	+
接触酶	+	+	+
氧化酶	+	-	-
过氧化氢酶	+	+	+

注:“+”“-”分别表示相应反应呈阳性、阴性。

2.3.2 菌株的分子鉴定 将GN6、JP2、JC1菌株的16S rDNA基因序列经Blast比对分析发现,GN6与假单胞菌K32(*Pseudomonas* sp.)的同源性高达100%,JP2与芽孢杆菌TU-10(*Bacillus* sp.)的同源性高达98%,JC1与芽孢杆菌BSn5(*Bacillus* sp.)的同源性高达98%,根据序列比对结果构建系统进化树(图4)。结合3株菌株的菌落形态、生理生化特性初步确定,GN6属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),JP2、JC1属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

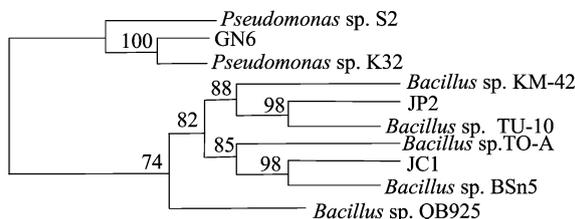


图4 GN6、JP2、JC1菌株系统进化树

2.4 盆栽试验结果

将菌株 GN6、JP2、JC1 及 3 株菌株的混合菌液稀释后接种于黄瓜幼苗根部,培养 30 d 后测量其株高和地上部干质量。由表 3 可以看出,接种 GN6、JP2、JC1 及 3 株菌株混合液后,黄瓜幼苗株高与对照组相比分别增加 21.2%、11.4%、14.4%、31.8%,地上部干质量与对照组相比分别增加 16.3%、15.1%、17.9%、25.3%,且 3 株菌株混合接种处理后的株高和地上部干质量与单独接种处理相比均显著增高 ($P < 0.05$)。该结果表明,菌株 GN6、JP2、JC1 对于黄瓜幼苗的生长具有促进作用,且 3 株菌株混合后对于黄瓜幼苗的促生长作用更为明显。

表 3 各菌株对黄瓜幼苗的促生作用

菌株	菌株株高 (cm)	地上部干质量 (g)
CK	111.74 ± 1.24	3.12 ± 0.23
GN6	135.44 ± 2.32a	3.63 ± 0.43a
JP2	124.52 ± 3.01a	3.59 ± 1.21a
JC1	127.88 ± 2.19a	3.68 ± 0.87a
混合	147.32 ± 3.14ab	3.91 ± 1.32ab

注:a 表示与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$);b 表示混合菌液处理与单独菌株处理相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

目前,微生物肥料已经成为农业科学的研究热点之一^[12-13],而不同功能的多菌株组合是主要的研究方向和重点。根据不同微生物所具有的生化和功能特性,采用新的技术手段,将多种菌株进行科学合理的组合,排除菌株间的相互拮抗,发挥联合菌株的共生协同作用,从而提高微生物肥料的功效,实现农作物的增产^[14]。

本研究通过观察菌株的透明圈大小初筛出固氮菌株、有机磷农药降解菌株、有机氯农药降解菌株各 8 株。根据其固氮能力、有机磷农药降解能力和有机氯农药降解能力复筛出 9 株菌株分别与黄瓜枯萎病病菌、黄瓜褐斑病菌进行拮抗性试验,筛选出 GN6、JP2、JC7、JC1 共 4 株菌株,最终通过菌株间的拮抗性试验筛选出 GN6、JP2、JC1 作为复合微生物肥料的菌株。将 3 株菌株分别接种至黄瓜幼苗根部,30 d 后黄瓜幼苗株高和地上部干质量均显著高于对照组,而 3 株菌株混合液接种处理后的黄瓜幼苗株高和地上部干质量显著高于单菌株处理组。

综上所述,本研究筛选出的 3 株菌株对黄瓜幼苗的生长

具有促生作用,可以作为复合微生物肥料的菌株,具有较大的应用潜力,对于黄瓜的大规模种植有一定的积极作用,同时可以修复被污染的土壤、改善土壤结构^[15]。但是仍需要通过大田试验作进一步的研究,其作用机制还需要进一步的探讨。

参考文献:

- [1]张瑞福,颜春荣,张楠,等. 微生物肥料研究及其在耕地质量提升中应用前景[J]. 中国农业科技导报,2013,15(5):8-16.
- [2]Marschner P,Kandeler E,Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment[J]. Soil Biology & Biochemistry,2003,35(3):453-461.
- [3]Zhang N,Wang D D,Liu Y P, et al. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains[J]. Plant and Soil,2014,374(1/2):689-700.
- [4]韩华雯,孙丽娜,姚拓,等. 苜蓿根际有益菌接种剂对苜蓿生长特性影响的研究[J]. 草地学报,2013,21(2):353-359.
- [5]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.
- [6]孙亚凯. 功能性微生物菌株的筛选及组合菌群活性研究[D]. 天津:天津大学,2006.
- [7]卢秉林,王文丽,李娟,等. 自生固氮菌的固氮能力及其对春小麦生长发育的影响[J]. 中国生态农业学报,2009,17(5):895-899.
- [8]张六六,夏森玉,丁亚欣,等. 有机磷农药高效降解微生物的筛选与鉴定[J]. 安徽农业科学,2015(36):212-215,253.
- [9]梁金钟,梅剑秋,王翼雪. 果蔬中残留有机磷农药降解菌的选育及鉴定[J]. 食品工业科技,2017,38(6):189-194.
- [10]强薇,郭帅,张爱华,等. 人参根际土壤中拮抗人参病害微生物的筛选[J]. 华南农业大学学报,2014(5):76-81.
- [11]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [12]任友花,王羿超,李娜,等. 微生物肥料高效解磷菌筛选及解磷机理探究[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):537-540.
- [13]常庆涛,刘荣甫,胡跃高,等. 生物菌肥对荞麦生长发育和产量的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):161-162.
- [14]Park J H,Bolan N,Megharaj M, et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil[J]. Journal of Hazardous Materials,2011,185(2/3):829-836.
- [15]梁晓琳,孙莉,张娟,等. 利用 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 研制复合微生物肥料[J]. 土壤,2015,47(3):558-563.