

影响微生物接种剂发挥作用的因素

杜晓燕^{1,2} 张富春³ 张小勇^{1*}

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

(3. 新疆大学生命科学与技术学院生物资源基因工程重点实验室 新疆 830046)

摘要: 大量施用化肥不仅造成了环境污染,而且也是一个能源消耗的问题。在生态农业中,通过向土壤中接种有益微生物部分替代化肥已是科学家研究的热点。微生物通过活化土壤养分、抑制病原菌、降解有毒污染物等方式发挥作用,然而,微生物要发挥功效必须在土壤中能够定殖。本文主要针对国内外在影响微生物根际定殖的因素以及影响引入微生物活性的因素两方面的研究进行综述,同时强调对接种剂引入所引起的生物种群及生态环境变化应予以重视。

关键词: 接种剂, 生物因素, 非生物因素

Factors Affect Efficiency of Bacterial Inoculation

DU Xiao-Yan^{1,2} ZHANG Fu-Chun³ ZHANG Xiao-Yong^{1*}

(1. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

(2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(3. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang 830046)

Abstract: The mass utilization of chemical fertilizer not only is a problem of environment, but also an energy issue. To inoculate beneficial microorganisms has been the topic of scientist to cope with it. The bacteria achieve the goal through the way of dissolving nutrients unavailable, restraining pathogeny, reducing deleterious compounds and so on. However, it should be colonized in soil first to realize its function. This paper summarized factors, both in biologic and abiologic aspects that affected successful colonization and activity of bacterial inoculation. The impacts of inoculated bacteria on population structure of specific rhizobacterial communities and environment should also be paid an eye on.

Keywords: Inoculation, Biologic factors, Abiologic factors

化肥作为当今重要的农用物资,对提高作物产量发挥了重要作用^[1]。然而,大量施用化肥带来了诸多问题:1) 土壤矿质化、板结现象严重,土壤有机质含量下降;2) 地面水体富营养化,地下水和饮用

水硝酸盐污染;3) 不合理施用化肥,导致农产品品质下降,蔬菜等硝酸盐含量过高,对人体健康形成潜在危害^[1]等等。为了缓解日益严重的土壤环境危机,发展现代生态农业,人们尝试着向土壤中引入

外来有益微生物,以期能够部分代替化肥,恢复并维持土壤肥力^[2],对已经造成的环境污染进行修复。被引入的微生物种类主要有:自生固氮菌、解磷细菌和解钾细菌、促进植物生长的根际细菌 PGPR、外生菌根菌和 VA 菌根菌、土壤微生物修复的菌株等。

引入外来微生物的作用机理主要有:①向植物提供养分。在古老的农业生产实践中,人们已经认识到种植豆类等作物能够肥田,19世纪末他们对肥田的本质有了科学的理解。后来,研究者发现,在非豆科植物中也存在接种合适菌株从而产生固氮作用的现象,这引起了研究者们极大的兴趣。2001年,Sevilla^[3]等发现在甘蔗上接种 *Acetobacter diazotrophicus* 可以向宿主植物直接供氮。此外,研究者们发现很多种微生物通过不同的机理为植物提供营养,如 PGPR 可以通过产生含铁载体,便利养分 Fe^{3+} 的运输^[4];解磷细菌和解钾细菌可以将土壤内不溶解的含磷、钾有机物和无机物分解成植物可以吸收利用的营养元素^[5]。②分泌植物激素、维生素、氨基酸等生理活性物质^[6],影响根的形态,增加根毛的长度和数量,增大根表面积^[7],从而有利于根吸收矿质养分和水分。③抑制病原菌。通过诱导系统抗性抑制病原菌生长,防治植物病害或者在植物根部快速繁殖,形成优势菌群,与有害微生物竞争养分与生态位点,从而限制其它病原微生物的繁殖机会^[8]。④改良土壤。微生物能产生糖类物质,占土壤有机质的 0.1%,与植物粘液、矿物胚体和有机胶体结合在一起,可以改善土壤团粒结构,增强土壤的物理性能和减少土壤颗粒的损失,在一定的条件下,还能参与腐殖质形成。⑤对于进入土壤中的农药及其它有机污染物的自净、有毒金属及其化合物在土壤环境中的迁移转化等都起着重要的作用^[9]。

理论上,微生物接种剂的应用意义显著,然而实际应用中,结果常常让人失望。引入的微生物接种剂要发挥其功效并不是想当然的事情,首先就要满足以下两个条件:1)在根际存活下来,达到一定的接种菌密度;2)要有活性。接种菌进入土壤后面临的第一个问题就是如何在根际定殖。根部定殖是在有土著微生物参与竞争的情况下,一种引入菌株在植物根部(包括外根圈,也包括根面或内根圈)定居繁殖的过程。大多数情况下,被接种的土壤是不利于微生物生存的^[10],那么,如何才能保证接入菌

在根际达到所需要的接种密度呢?除此之外,定殖的微生物是否具有活性呢?这些都是人们所关注的问题。本文主要针对国内外在影响微生物根际定殖且达到一定接种菌密度的因素以及影响引入微生物活性的因素两方面的研究进行了综述,同时,简单介绍了引入外来菌对自然生态系统产生影响。

1 影响微生物接种剂成功定殖的因素

一般来说,微生物接种剂到达其发挥作用位点要经历表面吸附、土壤的过滤等重重障碍,同时,接种菌本身的特征及其与土壤动物、微生物之间的相互作用也将影响接种剂的定殖。总结影响微生物接种剂在根际定殖的因素可以分为两方面:生物因素和非生物因素。

1.1 生物因素

土壤中存在大量的生物,包括细菌、真菌、放线菌、藻类和原生动物等,引入的接种剂进入土壤,必然与这些生物发生作用。此外,接种剂自身的生理特征、表面性质也对其在根际的有效定殖发挥作用。

1.1.1 土壤生物的作用:(1)土壤动物。土壤动物对引入菌的作用是双面的。一方面,土壤动物的捕食行为将减少接种菌的数目^[11];另一方面,土壤动物在土壤中运动可以改善土壤环境,如通气性、降低土壤密度等,从而有利于接种菌在土壤中的运动^[12];土壤动物粉碎、搅拌、混合土壤凋零物等,使细菌更容易接近可利用碳源^[13]。Habte 等^[14]研究发现,土壤动物对引入的接种菌数量的稳定起着重要作用。Knox 等^[15]采用不会发生水的质流运动的物理条件明确的两种对照土壤进行试验,发现在有线虫存在下, *Pseudomonas fluorescens* SBW25 菌株存活量明显增加。然而,土壤动物的捕食行为是否具有特异性以及这种专属性的程度都不得而知^[16]。(2)土壤中其它微生物的作用。土壤中的微生物种类繁多,代谢类型也多样。在植物根围,根据与植物的关系,又可分为有益(2%~5%)、有害(8%~15%)、中性(80%~90%)三类,因而接种菌与其它微生物的关系很复杂。一方面,其它微生物与接种菌竞争养分,抢占生态位点^[16]或分泌有毒物质抑制接种菌的存活^[17]。另一方面,土壤中可能存在着某些能与接种菌形成共代谢的菌株,从而协同发挥作用。

1.1.2 接种剂自身的因素:接种剂自身向根际分泌物的趋化性是影响其在根际有效定殖的一个重要因

素。Misaghi 等^[18]采用几株 *P. fluorescens* 和 *Bacillus* sp. 的去鞭毛突变株进行试验, 突变株在根际定殖能力削弱, 证明了细菌主动运动在番茄根际定殖中的作用。1992 年, Gamliel 和 Katan^[19]在蒸馏过的土壤中所做的实验说明, *P. fluorescens* 能被种子根际分泌物所吸引的特性, 在根部定殖中的作用很大。此外, 有研究表明, 接种菌细胞表面的性质对于根和其它植物表面的吸收和对土壤中胶体的长久粘附以及与其它细菌的识别十分重要^[20]。

1.2 非生物因素

1.2.1 土壤温度: 微生物的生长都有一个最适的温度范围, 在这个温度范围内, 微生物的生命活动可以正常进行。Ratray^[21]和 Bowers^[22]发现低温有利于根际定殖。Andreoglou 等^[23]研究温度对 *Pseudomonas oryzihabitans* 的运动影响表明, 在密闭容器中, *Pseudomonas oryzihabitans* 在 26℃ 时适宜运动, 而在低于 18℃ 时运动受限。在土壤中, 16℃ 运动和存活都受到抑制; 而在 25℃ 时没有影响。土壤温度是一个不可调节的因素, 接种菌的种类不同, 对温度的要求也不一样。因此, 向土壤中接种有益微生物, 必须选择适当的时间、季节施入以保证微生物的存活。

1.2.2 土壤类型的影响: 不同类型的土壤, 其有机质含量、密度等性质差异很大。质地好的肥土, 其中所含的有机物的种类和数量比较多, 对微生物的定殖比较有利。密度高的土壤, 由于限制了根际分泌物的流动, 反而有利于接种菌的繁殖^[24]。

1.2.3 土壤湿度: Elsas 等^[25]发现, 土壤持水量适中, 有利于根际细菌种群繁殖。Andreoglou 等^[23]也证明, 在 16℃ 和 25℃ 两个温度下, *Pseudomonas oryzihabitans* 在湿土中的运动比在干土中快。此外, 灌溉在促进根际菌的定殖中也具有重要作用, 水的流动可以带动接种菌运动, 找到适合的定殖位点。Bowers 和 Parke^[22]发现, 在没有水质流运动的影响下, 接种菌的母体与去鞭毛突变株在根际定殖效果没有差别。这表明, 对于有鞭毛的接种菌, 水质流运动在其定殖中发挥着重要的作用。但是土壤含水量过高, 使原本具有保护作用的孔隙被土壤水分占有, 同时土壤中氧气状态也受到影响, 不利于微生物存活。

1.2.4 土壤中碳源、氮源的影响: 土壤是一个贫营养的系统^[26], 所谓的贫, 不是指总量上的缺乏, 而是基于土壤中可利用碳的不易降解性以及微生物对

碳源的不易触及所导致的可利用碳源的缺乏。土壤中可利用碳含量的多少, 影响着土壤微生物群落结构^[27]。根际分泌物作为接种菌重要的碳素营养来源, 其可利用性在微生物定殖中发挥重要作用。Strigul 等^[28]采用数学模型与计算机模拟仿真来研究微生物接种菌在根际的定殖, 仿真结果表明, 接种菌与植物宿主根际分泌物的兼容性对接种菌的定殖影响很大。接种菌接种密度的大小也与根际分泌物的可利用性有很大关系, 如果分泌物相对专一地被接种菌所利用, 则接种菌密度可以减小, 就能满足定殖及发挥作用; 反之, 则可能接种量再大也不能形成优势菌群。Battista-Leboeuf 等^[29]对从玉米根际分离的 5 类菌株在培养了 15 d 和 30 d 之后的演化情况进行了分析, 结果表明, 由于玉米根际分泌物的性质和数量在根系和植株生长的阶段不同, 培养 15 d, 5 类菌株均有很好的表达, 而培养 30 d, 只有 3 类菌株表达。

Kavadia 等^[30]研究自生固氮菌在逆境中的动力学发现, 在有与自生固氮菌竞争的菌种存在的恒化器中, 当碳源充足时, 两种微生物对碳源的竞争比较小, 两种菌均吸收大量的胺态氮, 且固氮菌在这种状况下, 也可以在一个很大的参数变化范围内生存; 当碳源不足时, 只有当固氮菌比其对手更具优势时才能生存, 若此时增大氮源的供应量, 则固氮菌丧失其生存的优势。由此可见, 接种不同类型的菌株, 还要对土壤的原始养分状况以及今后将要施入的养分有明确地了解才行。

1.2.5 施用农药、除草剂的影响: 农药、除草剂是农业生产中常用的化学试剂, Das 等^[31]研究发现微生物能够利用农药及其降解产物作为碳源及其它营养成分的来源, 农药的使用, 使需氧非共生固氮菌和解磷菌的数量增加, 且对固氮菌的影响比解磷菌大。同时, 农药可以减少杂草对作物的竞争, 使作物释放更多的有机碳化合物, 供根际微生物生长。除草剂的使用可以增加固氮菌以及解磷菌的活性。但是也有研究表明, 杀虫剂对土壤中微生物产生毒害作用^[32]。

1.2.6 接种菌接入的位置: 接种菌接种的部位也对定殖产生影响, Dijkstra 等^[33]研究表明, 接种菌只有接入根延长区, 才会向根尖移动; Battista-Leboeuf 等^[29]研究发现, 经过 15 d 的培养, 只有根尖和接近植物茎的地方有接种菌定殖。根尖和根的延长区, 根

际分泌物比较多,将接种菌接入这些部位,由于其碳源的直接可利用性,更有利于接种菌的存活。

1.2.7 接种菌预处理: Cunliffe 等^[34]将多环芳烃降解菌经过 4 种预处理:复杂培养基、简单培养基、饥饿、菲类化合物驯化。结果显示,预处理之后有稳定的定殖,而且降解活性增强。因此,对于需要在特殊环境,比如高温、盐碱等环境中接种的情况,为使得接种菌可以存活,应对接种菌进行相应的抗性处理或者从当地采集分离已经经过长期环境改造的优势菌。

2 影响引入微生物活性的因素

引入的微生物在不利于其自身生存的条件下存活下来是其发挥功效的第一步,然而,接种菌必须在土壤中具有所期望的活性才能实现其价值。在影响微生物活性的因素研究方面,一种观点认为,菌接种时所处的生命周期对接种菌的活动有影响。1964 年, Brown 等^[35]将培养了不同时间的接种菌液接种在小麦上,发现定殖菌的数量与培养的时间有关,培养了 14 d 的培养液效果最好。实验说明,培养时间长的菌种在外表面形成硬壳,将接种菌保护起来免受干燥等恶劣环境的危害。另一种观点认为,微生物的适当预处理可以增强其活性^[34]。

3 引入接种菌对土壤原有种群的影响

向土壤引入微生物接种剂,引起人们的广泛兴趣,然而,向自然生态系统引入外来菌可能会打乱土著微生物的生存状态,使得某些有重要作用的微生物瓦解。Herschkovitz 等^[36, 37]采用变性梯度凝胶电泳指纹分析发现,接种 *A. brasilense* 对在根尖和根分支的其它细菌结构组成没有影响,而植物年龄对微生物数量的影响较大。Kozdroj 等^[38]也证明, *Pseudomonas* 对土著微生物的影响很小,对土壤动物总量的影响也很小。他们认为,在玉米根际存在着一个土著微生物的动态平衡。Kokalis-Burelle 等^[39]进行的田间试验表明,接种 PGPR 不会对土著荧光假单胞菌和产生含铁载体的细菌等有益土壤微生物产生不良影响,它虽然可以增加根际真菌数量,但是不会增加根部疾病的发生率,可能是由于增加了非致病真菌的数量。尽管目前来看,引入外来有益微生物对土壤原有种群的负面影响还没有报道,但是我们呼吁生态学家应加强对土壤微生物生态平衡

的监测与评估,同时,应尽量从土著菌中筛选目的菌株,尽量避免对原有土壤微生物种群结构的扰动。

4 研究展望

引入微生物接种剂可以改善土壤环境、节约能源,具有重要的生态意义。然而目前接种剂效用发挥的实际值与理想值之间存在很大差距,因而今后仍需在影响接种剂在根际大量定殖的施用技术以及影响接种剂活性因素方面多做研究。但是,我们还应强调一点,对接种剂引入所引起的被接入区的生物种群及生态环境变化要予以重视。

参 考 文 献

- [1] 曹仁林, 贾晓葵. 我国集约化农业中氮污染问题及防治对策. *土壤肥料*, 2001, 3: 3-6.
- [2] 李俊, 姜昕, 李力, 等. 微生物肥料的发展与土壤生物肥力的维持. *中国土壤与肥料*, 2006, 4: 1-5.
- [3] Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, *et al.* Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif⁻ mutant strains. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2001, 14(3): 358-366.
- [4] Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, *et al.* The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 30(5-6): 433-439.
- [5] Kim KY, Jordan D, McDonald GA. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 26(2): 79-87.
- [6] Glick BR, Penrose DM, Li JP. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, 190(1): 63-68.
- [7] Galleguillos C, Aguirre C, Barea JM, *et al.* Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science*, 2000, 159(1): 57-63.
- [8] Elad Y, Baker R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydo-spore germination of spp. by *Pseudomonas* spp.. *Phytopathology*, 1985, 75(9): 1053-1059.
- [9] Middeldorp PJM, Briglia M, Salkinoja-Salonen MS. Biodegradation of pentachlorophenol in natural polluted soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microbial Ecology*, 1990, 20(1): 123-139.
- [10] Ho WC, Ko WH. Soil microbiostasis: effects of environ-

- mental and edaphic factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 1985, **17**(2): 167–170.
- [11] Habte M, Alexander M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Applied Microbiology*, 1975, **29**(2): 159–164.
- [12] Gammack SM, Paterson E, Kemp JS, et al. Factors affecting the movement of microorganisms in soils. In G Stotzky and J Bollag (ed.). New York: Soil biochemistry, Marcel Dekker, 1992, pp. 263–305.
- [13] 胡亚林, 汪思龙, 颜绍旭. 影响土壤微生物活性与群落结构因素研究进展. *土壤通报*, 2006, **37**(1): 170–176.
- [14] Habte M, Alexander M. Further evidence for the regulation of bacterial populations in soil by protozoa. *Journal Archives of Microbiology*, 1977, **113**(3): 181–183.
- [15] Knox OGG, Killham K, Artz RRE, et al. Effect of nematodes on rhizosphere colonization by seed-applied bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **7**(8): 4666–4671.
- [16] van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(2): 121–135.
- [17] Acea MJ, Moore CR, Alexander M. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, **20**(4): 509–515.
- [18] Misaghi IJ, Olsen MW, Billotte JM, et al. The importance of rhizobacterial mobility in biocontrol of bacterial wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, **24**(4): 287–293.
- [19] Gamliel A, Katan J. Chemotaxis of *fluorescent pseudomonads* towards seed exudates and germinated seeds in solarized soil. *Phytopathology*, 1992, **82**(3): 328–332.
- [20] Chet I, Baker R. Introduction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 1980, **70**(10): 994–998.
- [21] Rattray EAS, Tyrrell JA, Prosser JI, et al. Effect of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonisation by lux-marked *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Soil Biology*, 1993, **29**(2), 73–82.
- [22] Bowers JH, Parke JL. Colonization of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: Effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, **25**(12): 1693–1701.
- [23] Andreoglou FI, Vagelas IK, Wood M1, et al. Influence of temperature on the motility of *Pseudomonas oryzae* and control of *Globodera rostochiensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, **35**(8): 1095–1101.
- [24] Ikeda K, Toyota K, Kimura M. Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizosphere. *Plant and Soil*, 1997, **189**(1): 91–96.
- [25] van Elsas JD, van Overbeek LS, Feldmann AM, et al. Survival of genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* in soil in competition with parent strain. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, **85**(1): 53–64.
- [26] Poindexter JS. Oligotrophy: feast or famine. *Advances in Microbial Ecology*, 1981, **5**: 63–89.
- [27] Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, et al. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, **31**(1): 145–153.
- [28] Strigul NS, Kravchenko LV. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental Modelling & Software*, 2006, **21**(8): 1158–1171.
- [29] Battista-Leboeuf CDi, Benizri E, Corbel G, et al. Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage. *Agronomie*, 2003, **23**(5-6): 441–446.
- [30] Kavadia A, Vayenas DV, Pavlou S, et al. Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations in antagonistic conditions. *Ecological Modelling*, 2007, **200**(1-2): 243–253.
- [31] Das AC, Debnath A. Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere*, 2006, **65**(6): 1082–1086.
- [32] Martinez-Toledo MV, Salmeron V, Gonzalez-Lopez J. Effect of an organophosphorus, insecticide, profenofos, on agricultural soil microflora. *Chemosphere*, 1992, **24**(1): 71–80.
- [33] Dijkstra AF, Scholten GHN, Van Veen JA. Colonization of wheat seedling (*Triticum aestivum*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Biology and Fertility of Soils*, 1987, **4**(1-2): 41–46.
- [34] Cunliffe M, Kawasaki A, Fellows E, et al. Effect of inoculum pretreatment on survival, activity and catabolic gene expression of *Sphingobium yanoikuyae* B1 in an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, **58**(3): 364–372.
- [35] Brown ME, Burlingham SK, Jackson RM. Studies on *Azotobacter* species in soil. Effect of artificial inoculation on crop yield. *Plant and Soil*, 1964, **20** (2): 194–214.
- [36] Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, et al. Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Journal of Microbial Ecology*, 2005, **50**(2): 277–288.
- [37] Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, et al. *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(11): 1847–1852.
- [38] Kozdroj J, Trevors JT, Elsas JD. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36**(1): 1775–1784.
- [39] Kokalis-Burelle N, Kloepper JW, Reddy MS. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 2006, **31**(1-2): 91–100.