

文章编号: 1000-5692(2007)06-0649-05

引入黄瓜根围的2株生防菌株的生态效应

张 昕¹, 张立钦¹, 林海萍¹, 张炳欣²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 通过对土壤中可培养微生物的种群计数和土壤酶质量分数变化的测定, 研究了引入黄瓜 *Cucumis melo* 根围土壤2株生防菌株 *Brevibacillus brevis* ZJY-1 和 *Bacillus subtilis* ZJY-116 的环境生态效应。结果表明, 生防菌株的施入对土壤中细菌的种群数量有短期影响, 但随着黄瓜生育期的延长, 施入生防细菌土壤的细菌数最终与对照土壤中细菌数持平; 生防细菌的施入对土壤中真菌和放线菌的种群数量影响不大, 在取样各时期, 经外源菌株处理的土壤中真菌和放线菌数量与对照相比差异均不显著。土壤酶质量分数的测定结果表明, 除过氧化氢酶外, 在植株生育期, 2株生防细菌的引入对土壤中蔗糖酶、脲酶和脱氢酶的质量分数均有不同程度的影响。酶活性普遍高于对照, 可见, 外源细菌的引入可提高土壤的肥力水平。图4表1参15

关键词: 土壤学; 生防菌株; 黄瓜; 根围土壤; 生态效应

中图分类号: S154.2

文献标志码: A

众所周知, 由于土壤微生物参与了土壤中几乎全部的物质循环和能量代谢, 并使作为陆地生态系统中重要组成部分的土壤与该生态系统的其他组分有了功能上的联系, 从而使整个生态系统得以维持平衡和发展^[1]。因此, 有研究者认为, 在影响土壤功能的诸多因素中土壤的生物活性可以看作是一个集中的反应。而土壤酶作为土壤中具有高度催化作用的蛋白质, 更是主导着土壤中与物质和能量转化有关的生物化学过程, 反映了土壤中进行的各种生物化学过程的动向和强度^[2-3], 对土壤肥力的形成和提高, 土壤生态系统的物质循环等具有重要的意义。已有许多学者以土壤酶的含量为指标成功地研究了土壤肥力水平的变化^[4-8]。笔者以引入外源微生物的黄瓜 *Cucumis melo* 根围土壤为材料, 采用室内模拟试验, 通过分析土壤中可培养的主要微生物种群的数量以及土壤酶活性的变化, 分别从传统的微生物培养和生物化学的角度研究了引入微生物对土壤微生物群落结构以及土壤质地的影响, 为微生物流入自然环境后的生态效应进行了初步安全性评估。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株生防细菌 *Brevibacillus brevis* ZJY-1 和 *Bacillus subtilis* ZJY-116 系浙江大学华家池校区生物所分离自温室大棚黄瓜根围土壤, 对多种病原菌生长有抑制作用^[9,10], 菌株ZJY-116 还可以显著促进

收稿日期: 2007-01-16; 修回日期: 2007-04-29

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30230250)

作者简介: 张昕, 讲师, 博士, 从事微生物生态研究。E-mail: zhangxi ns @126.com

黄瓜生长^[11]。分离真菌用培养基为马丁氏孟加拉红琼脂培养基；分离细菌用培养基为牛肉膏蛋白胨培养基(NA)；分离放线菌用培养基为高氏1号。供试的作物与土壤：供试作物为黄瓜(品种：新泰密刺)。土壤采自浙江大学华家池校区蔬菜地。化学试剂为国产的分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液和盆栽用土壤的准备 菌悬液制备：菌株ZJY-1和ZJY-116在NA平板上分别培养24 h后，用无菌水稀释至 $A_{600\text{ nm}}=1$ (即ZJY-1约为 6.8×10^{10} 个·L⁻¹，ZJY-116约为 7.4×10^{10} 个·L⁻¹)备用。

新鲜土壤取回后过20目筛，称量后与上述各细菌悬液适量混合均匀，使得引入微生物的最终数量约为 10^6 个·g⁻¹。实验设以同样体积的无菌水混合的土壤作为对照。

1.2.2 盆栽实验设计 将上述土壤装钵，每种处理的土壤装10钵，设3次重复。每钵播种催芽过的黄瓜种子7粒，出苗后每隔3 d浇1次水，水量与对照相同。黄瓜出苗后每14 d随机取样各处理营养钵中表层以下3~5 cm土壤10 g，3次重复。为模拟植株死亡后土壤中微生物结构及理化性质的活性变化，到第42天时人为将盆钵中黄瓜植株拔除，继续对其中土壤进行取样。

1.2.3 引入环境拮抗细菌的生态效应 ①对土壤中可培养主要微生物种群数量的影响。称取约10 g鲜土样置于已灭菌的装有玻璃珠的三角瓶中，加入90 mL无菌水，振荡10 min使土样分散成为均匀的土壤悬液。对土壤悬液进行梯度稀释，取合适的稀释度涂平板，一般好氧异养细菌采用 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 稀释度，放线菌采用 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 稀释度，真菌采用 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 稀释度。将涂布均匀的平板倒置于30℃培养一定时间(细菌3~5 d，放线菌10~14 d，真菌5~7 d)，进行计数。好氧异养细菌、放线菌和真菌的活菌计数培养基分别为牛肉膏蛋白胨培养基、高氏1号琼脂培养基和马丁氏孟加拉红琼脂培养基。②引入环境的拮抗细菌对土壤酶含量的影响。土壤经细菌化处理后分别于播种当日、第14天、第28天、第42天和第56天后提取盆钵中土壤，经风干后测定其中各酶类含量。脱氢酶含量测定参照朱南文等^[12]方法进行，蔗糖酶、脲酶及过氧化氢酶含量的测定参照Alcf等^[13]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌对土壤主要可培养微生物种群数量的影响

拮抗细菌对土壤中主要可培养微生物种群数量的影响见表1。由表1可知，生防细菌的施入对土壤中细菌的种群数量有短期影响。最初，经外源拮抗菌株处理的土壤中的细菌总量高于无菌水处理的对照，但随着黄瓜生育期的延长，根系分泌物质的增加，对照土壤中，细菌数量逐渐增加，而经处理的土壤中的细菌数逐渐下降。42 d后2种土壤中的细菌总数处于持平状态。

另外-研究发现，接种外源细菌的土壤中真菌数量普遍低于对照土壤的数量，但差异不明显。外源细菌的引入对土壤中放线菌的影响不及植株生育期对放线菌的影响大。随着植株的生长，土壤中放线菌的数量逐渐增加，到第42天时，数量达到高峰，但随着植株的人为拔除，土壤中可利用有机物质的减少，数量又有所回落。

2.2 引入环境的拮抗细菌对土壤酶类活性的影响

表1 拮抗细菌对土壤中主要微生物种群数量的影响

Table 1 Effect of antagonistic strains on population of microorganisms in the soil

时间 d	微生物数量(对数细胞数)/(个·g ⁻¹)								
	细菌			真菌			放线菌		
	ck	ZJY-1	ZJY-116	ck	ZJY-1	ZJY-116	ck	ZJY-1	ZJY-116
0	5.27 a	6.53 b	6.96 bc	3.38 a	3.38 a	3.39 a	4.10 a	4.10 a	4.10 a
14	6.79 a	7.47 b	7.51 b	3.79 a	3.77 a	3.74 a	4.65 a	4.63 a	4.63 a
28	7.18 a	7.23 b	7.25 b	4.13 a	4.11 a	4.11 a	4.91 a	4.88 a	4.89 a
42	7.49 a	7.51 a	7.53 a	4.64 a	4.61 a	4.63 a	5.11 a	5.08 a	5.10 a
56	7.03 a	7.04 a	7.07 a	4.61 a	4.57 a	4.60 a	5.09 a	5.07 a	5.07 a

说明：表中数据为3次重复的平均值；微生物数量以鲜土计数；表中字母代表同一取样期不同处理的方差分析结果的差异显著性， $P<0.01$ 水平。

后(42 d后)各处理项脱氢酶质量分数均开始下降。与不接菌的对照相比，混有外源生防菌株的土壤中

脱氢酶质量分数始终较高,说明外源生防菌株的引入增加了土壤中微生物的总活性。

2.2.2 对土壤脲酶质量分数的影响 土壤脲酶主要来源于植物和微生物,是决定土壤中氮转化的关键酶,其质量分数高低反映了各种生化过程的方向和强度。由图2 可见,盆钵中土壤脲酶质量分数总体上随植株生育期推进而呈上升趋势,42 d 后随植株拔除后开始下降。与不接菌的对照相比,混有外源生防菌株的土壤中脲酶质量分数始终较高,说明引入外源生防菌株的土壤中氮素转化旺盛。

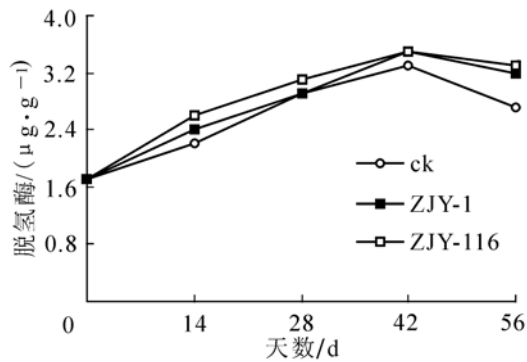


图1 引入拮抗细菌对土壤脱氢酶的影响

Figure 1 Effect of introduced antagonistic strains on the activities of dehydrogenase in the soil

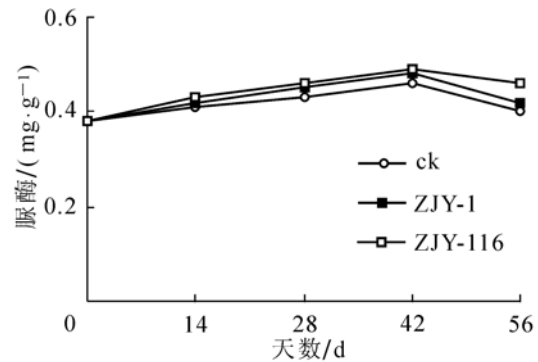


图2 引入拮抗细菌对土壤脲酶的影响

Figure 2 Effect of introduced antagonistic strains on the activities of urease in the soil

2.2.3 对土壤过氧化氢酶质量分数的影响 土壤中过氧化氢酶测定结果表明,在取样的各时段,引入外源生防菌株的土壤中过氧化氢酶活性与对照相比没有明显不同。由此可见,外源生防菌株的引入对土壤中过氧化氢酶的质量分数没有影响(图3)。

2.2.4 对土壤蔗糖酶质量分数的影响 土壤蔗糖酶活性的强弱反映了土壤熟化程度和肥力水平。由图4 可见,根际土壤蔗糖酶活性在植株生育盛期较高,衰亡期较低。引入外源生防菌株的土壤中蔗糖酶活性在最初的2 周内与对照差异不大,但2 周后均明显高于对照,说明外源生防菌株的引入增加了土壤的熟化程度和肥力水平。

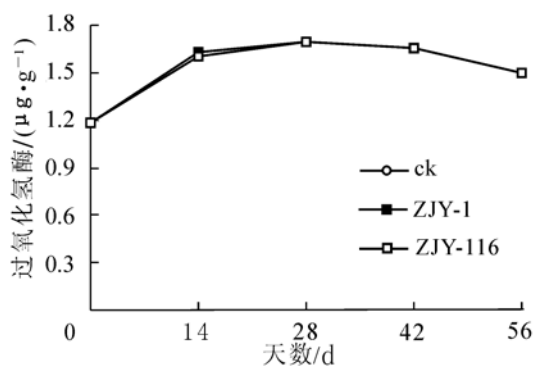


图3 引入拮抗细菌对土壤过氧化氢酶的影响

Figure 3 Effect of introduced antagonistic strains on the activities of hydrogen peroxidase in the soil

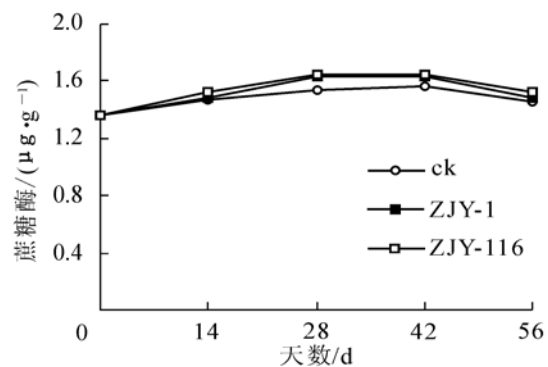


图4 引入拮抗细菌对土壤蔗糖酶的影响

Figure 4 Effect of introduced antagonistic strains on the activities of fructosidase in the soil

3 结论

微生物引入环境发挥生态效应之前,研究引入微生物对土著微生物群落结构以及周边生态环境的影响,进行初步安全性评估已成为国际共识。然而大量微生物的不可培养性是传统微生物生态学在揭示自然界微生物群落组成、生态功能及相互关系研究中的最大障碍。许多研究已经证实,通过传统的分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总量的0.1%~10.0%^[15],使得单一种群生命活动对于整个群

落功能的贡献和作用难以测量和评价。为避免上述弊端,作者采用传统的分离培养计数和土壤酶活性测定相结合的手段,利用室内盆栽模拟实验,探讨了外源微生物引入土壤环境后可能造成的生态影响。经过分析得到了以下结论:

分离培养计数的结果表明,生防细菌的施入对土壤中细菌的种群数量有短期影响。尽管最初,经外源拮抗菌株处理的土壤中的细菌总量高于无菌水处理的对照,但随着黄瓜生育期的延长,根系分泌物质的增加,对照土壤中的细菌数量逐渐增加,而经处理的土壤中的细菌数逐渐下降,最终 2 种土壤中的细菌总数处于持平状态。另外,研究发现,接种外源细菌的土壤中真菌数量普遍低于对照土壤的数量。原因可能是引入细菌与土壤中的土著真菌群落竞争了空间并掠夺营养,从而抑制了真菌的生长之故。外源细菌的引入对土壤中放线菌的数量略有影响,但不及植株生育期对放线菌的影响大。

引入的 2 株拮抗细菌对土壤中各种酶的含量效应不同,除过氧化氢酶外,测定的其他 3 种酶均不同程度受到影响。与对照相比,外源微生物的引入仅造成黄瓜生育期内土壤中蔗糖酶的短期变化。当植株被人为拔除后,细菌化的土壤和对照中蔗糖酶含量几乎无差异;而引入的微生物对脲酶和脱氢酶的影响则较大,持效较长,即使在土壤中已没有植株生长,其含量仍然较对照为高,脱氢酶所受影响尤其明显。2 个菌株表现出一致性。

植物根系及其残体、土壤动物及其遗骸和微生物所分泌的酶流入土壤,能催化土壤中复杂的有机物质转化为简单的无机化合物,供植物再利用,参与了包括土壤生物化学过程在内的自然界物质循环,因此土壤酶含量与土壤肥力有着十分密切的关系。笔者的研究也证实,土壤酶的含量会随播种植物生长季节的变迁而改变,当土壤中有植株生长,能够产生根系分泌物,有机质含量较多时,酶含量较高,在黄瓜拔除(第 42 天)后各微生物的数量相对减少,土壤肥力有所下降时,各酶的含量又有所回落。研究同时发现由于外源细菌的引入,在植株的生育期土壤中蔗糖酶、脲酶和脱氢酶的含量普遍较对照高,从而增加了土壤的肥力水平。这也许是 2 株拮抗细菌,尤其是 ZJY-116 能显著促进植物生长的一个重要原因。

参考文献:

- [1] DICK R P, TABATABAI M A. *Significance and Potential Uses of Soil Enzymes: Application in Agriculture and Environmental Management* [M]. New York: Marcel Dekker Press, 1993: 95-125.
- [2] BOLTON H J, ELIOTT L F, PAPENDICK R I, *et al*. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices [J]. *Soil Biol Biochem*, 1985, **17**: 297-302.
- [3] 张志丹, 赵兰坡. 土壤酶在土壤有机培肥研究中的意义[J]. 土壤通报, 2006, **37** (2): 362-368.
- [4] 杜国坚, 黄天平, 张庆荣, 等. 杉木混交林土壤微生物及生化特征和肥力[J]. 浙江林学院学报, 1995, **12** (4): 347-352.
- [5] 姜培坤, 俞益武, 张立钦, 等. 雷竹林地土壤酶活性研究[J]. 浙江林学院学报, 2000, **17** (2): 132-136.
- [6] NASEBY D C, MOENNE-LOCCOZ Y, POWELL J, *et al*. Soil enzyme activities in the rhizosphere of field-grown sugar beet inoculated with the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* F113 [J]. *Biol Fertil Soils*, 1998, **27**: 39-43.
- [7] 薛冬, 姚槐应, 何振立, 等. 红壤酶活性与肥力的关系[J]. 应用生态学报, 2005, **16** (8): 1455-1458.
- [8] 王娟, 谷雪景, 赵吉. 羊草草原土壤酶活性对土壤肥力的指示作用[J]. 农业环境科学学报, 2006, **25** (4): 934-938.
- [9] 张昕, 张炳欣, 喻景权, 等. 生防菌 ZJY-1 及 ZJY-116 的 GFP 标记及其在黄瓜根围的生态适应性[J]. 应用生态学报, 2005, **16** (11): 2144-2148.
- [10] 张昕, 张立钦, 马良进, 等. 生防菌 ZJY-1 抑菌作用的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (1): 91-95.
- [11] 张昕, 张炳欣, 赵宇华, 等. 多功能菌群混合施用的生态效应[J]. 应用生态学报, 2005, **16** (10): 1909-1912.
- [12] 朱南文, 闵航, 陈美慈, 等. 甲胺磷对土壤中磷酸酶和脱氢酶活性的影响[J]. 农村生态环境, 1996, **12** (2): 22-29.
- [13] ALEF K, NANNIERI P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* [M]. London: Academic Press, 1995: 214-219.

- [14] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, **59** (1): 143–169.
- [15] MACURA J. Trends and advances in soil microbiology from 1924 to 1974 [J]. *Geoderma*, 1974, **12**: 311–329.

Biocontrol agents introduced into a *Cucumis melo* rhizosphere

ZHANG Xin¹, ZHANG Li-qin¹, LIN Hai-ping¹, ZHANG Bing-xin²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

Abstract: By quantifying cultural microorganisms and analyzing activities of enzymes in the soil, the ecological effect of biocontrol agents, *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116, introduced into the *Cucumis melo* (cucumber) rhizosphere was studied to improve soil fertility. We used potculture method with three replications, one replication having ten pots of cucumber seedlings with the agent treated soil. 10 g soil was taken to measure every other week after the seedlings come out. Results showed that the introduced strains initially increased the bacterial population, but the influence gradually diminished with further plant growing. Introduction of the two strains caused no significant differences in fungi ($P > 0.01$). Compared to the untreated soil, enzyme activities showed that during the plant growing season, the two biocontrol agents increased fructosidase, and dehydrogenase activity. Thus, the study indicated that introduction of the two strains could increase soil fertility. [Ch, 4 fig. 1 tab. 15 ref.]

Key words: pedology; biocontrol agents; *Cucumis melo* (cucumber); rhizosphere; ecological effects

张齐生、金爱武荣获“全国林业产业突出贡献奖”

2007 年8 月20 日，全国林业产业大会暨中国林业产业协会成立大会在杭州召开，浙江林学院校长张齐生院士等156 人被中国林业产业协会授予“全国林业产业突出贡献奖·先进个人”荣誉称号。浙江林学院获得该荣誉的还有竹类研究所金爱武研究员。

《关于颁发全国林业产业突出贡献奖的决定》说：近年来，林业产业快速发展，产业规模不断扩大，经济实力不断增强，林产品供给能力不断提高，为推动生态建设和经济社会发展发挥了重要作用。为进一步推动林业产业发展，激发广大林业产业工作者的积极性和创造性，经研究决定，授予北京市花卉协会60 个单位“全国林业产业突出贡献奖·先进单位”荣誉称号，北京市蜂业公司等75 家企业“全国林业产业突出贡献奖·先进企业”荣誉称号，刘进祖等156 名同志“全国林业产业突出贡献奖·先进个人”荣誉称号，并予通报表彰。

据悉，浙江共有2 家先进单位、3 家先进企业、4 名先进个人获得“全国林业产业突出贡献奖”荣誉称号。

(天衣)