

生防菌 XG-1 对西瓜根际微生物群落及酶活的影响

孙正祥, 王 丰, 周 燚*

(长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 通过分离计数西瓜根际微生物的种群数量及测定根际土壤酶活的变化, 研究了生防菌 XG-1 对西瓜根际的生态效应。结果表明, 接种生防菌 XG-1 后 20 d 内, 西瓜根际土壤的真菌数量普遍低于对照; 细菌数量显著高于对照, 后期差距略有缩小; 放线菌的数量无显著变化。土壤酶活的测定结果表明, 接入生防菌 XG-1 后 50 d 内, 根际土壤脱氢酶活性变化较小, 处理土壤的脱氢酶活性稍高于对照土壤; 土壤脲酶活性在前期低于对照, 30 d 后超过对照; 土壤过氧化氢酶活性几乎不受影响, 处理土壤与对照土壤的酶活变化曲线都比较平稳。

关键词: 生防菌; 根际; 微生物群落; 酶活

中图分类号: S476 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)04-0107-04

Effect of Biocontrol Strain XG-1 on Microbial Populations and Enzyme Activity in Rhizosphere Soil of Watermelon

SUN Zheng-xiang, WANG Feng, ZHOU Yi*

(College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: This paper studied ecological effect of biocontrol strain XG-1 on rhizosphere soil of watermelon by isolating and counting rhizosphere microbial populations, and testing changes of enzyme activity. The results showed that in twenty days after inoculation of the strain XG-1, the number of fungi in watermelon rhizosphere was generally lower than the control group treated by sterile water; the number of bacteria was obviously higher than the control group and the gap narrowed slightly later; the number of actinomyces showed no significant change. The test result of enzyme activity in rhizosphere soil showed that in fifty days after inoculation of the strain XG-1, the dehydrogenase activity varied a little, with the XG-1 treatment slightly higher than the control; the urease activity was lower in early stage, and exceeded the control thirty days later; the peroxidase activity was rarely affected by XG-1, and its variation was relatively stable both in the XG-1 treatment and the control.

Key words: biocontrol strain; rhizosphere; microbial populations; enzyme activity

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)引起的维管束土传病害, 是西瓜上危害性最大的病害之一^[1]。该病害的发生可大幅度降低西瓜的产量和品质, 据统计, 一般发病率为 10%~30%, 严重的达 80%~

90%, 重茬地甚至造成绝产^[2]。目前, 对该病害尚无理想的防治方法, 传统的轮作虽在一定程度上能减轻病害发生, 但随着市场对西瓜需求量的增长, 西瓜种植规模逐年扩大, 轮作防病措施受到限制^[3]。

微生物是土壤生态系统的重要因子, 其群体数

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 湖北省教育厅中青年项目(Q2011130)

作者简介: 孙正祥(1980-), 男, 湖北黄冈人, 讲师, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: sunzhengxiang9904@126.com

* 通讯作者: 周 燚(1972-), 男, 湖北钟祥人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: yiyizhou@yahoo.com.cn

量代表着土壤的活力。植物根际区域的微生物对植物具有重要的影响,如参与物质和能量的循环,降解有害物质,调节植物生长,抑制植物病害等^[4-5]。真菌、细菌和放线菌在植物根围微生物中占据主要位置,在一定的自然环境中,微生物群落之间通过相互作用而达到平衡^[6]。多数土传病害的发生首先由病原物从寄主的根部侵入,其受到根围微生物的影响,因此,了解植物根围微生物种群的变化,可以更加合理有效地防治土传病害^[7]。大量引入生防菌株虽然可以减少植物病原菌的群体数量,但同时也会影响非病原微生物,包括一些有益微生物类群的数量和生态分布,甚至可能会破坏原有生态环境的平衡^[8]。因此,从生态学角度考虑,在应用生防菌之前有必要对它们可能造成的影响进行分析,以减少不必要的损失。菌株 XG-1 是本实验室(长江大学植物病理实验室)从西瓜植株内分离到的一株内生细菌,平板对峙和盆栽试验均表明其对西瓜枯萎病具有较大的生防潜力,本试验拟研究菌株 XG-1 对西瓜根际土壤微生物群落和酶活的影响,为其菌剂的研发与应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 西瓜苗的培养 选择饱满的西瓜种子(品种为常丰新西农八号),用 0.1% HgCl_2 消毒 3 min,灭菌水冲洗 3 遍,置于 28 °C 恒温浸泡 24 h。露白后 26 °C 催芽 2 d,待胚根长至 1 cm 左右,选取生长一致的种子播种于育苗盘,待西瓜苗长至 3 片真叶期移栽。

1.1.2 生防菌 XG-1 菌悬液的制备 生防菌 XG-1 由本实验室分离保存。经 NA 平板上活化的 XG-1 纯培养后移至 NB 培养液中,28 °C、160 r/min 振荡培养 24 h,获得种子液。按 1% (V/V) 接种种子液到 NB 培养液中,培养发酵 72 h,用灭菌水稀释成 1.0×10^9 cfu/mL 的菌悬液,备用。

1.1.3 培养基的制备 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):称取马铃薯 200 g,加入适量蒸馏水煮沸 20 min,用 3 层纱布过滤,取滤液。再加入葡萄糖 15 g、琼脂粉 15 g,补充蒸馏水定容至 1 L。使用前加入 0.5% 链霉素以免细菌污染。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA):称取牛肉浸膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂粉 20 g,补充蒸馏水至 1 L,调 pH 值 7.2。以不加琼脂粉的 NA 培养基为 NB 培养液。

高氏一号培养基:称取可溶性淀粉 20.0 g,

KNO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,琼脂粉 20.0 g,补充蒸馏水至 1 L,调 pH 值 7.2。

1.2 方法

1.2.1 生防菌 XG-1 对西瓜根际微生物群落的影响试验

1.2.1.1 生防菌处理与土样采集 采集新鲜土壤,过筛($\Phi=0.83$ mm),称量后与适量 XG-1 菌悬液混合均匀,使得土壤中菌株 XG-1 的最终数量约为 1.0×10^6 cfu/g。以加入相同体积无菌水混合的土壤为对照。将盆栽土装钵,把 3 片真叶期的西瓜苗移入其中,每钵 2 株,常规管理。分别于移栽后 5、10、20 d 随机采取西瓜根际土样,采集时用小铲将西瓜的根挖出一半,然后用毛刷将根表的土壤刷下,备用。

1.2.1.2 西瓜根际土壤微生物的分离与计数 取 10 g 根际土样加入 90 mL 无菌水,摇床振荡 30 min,静置 10 min,取 1 mL 上清液梯度稀释,依次得到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 等系列稀释液。(1)真菌的分离:分别取 50 μL 稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液接种于 PDA 平板中,涂布均匀,置于 25 °C 下培养 3 d,计数土壤中真菌的菌落个数,每个梯度重复 3 次。(2)细菌的分离:分别取 50 μL 稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的稀释液均匀涂布于 NA 平板中,置于 28 °C 下培养 2 d,计数土壤中细菌的菌落个数,每个梯度重复 3 次。(3)放线菌的分离:分别取 100 μL 稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液接种于高氏一号平板中,涂布均匀,置于 25 °C 下培养,计数土壤中放线菌的菌落个数,每个梯度重复 3 次。

1.2.2 生防菌 XG-1 对西瓜根际土壤酶活的影响试验 西瓜苗移栽后 5、10、20、30、50 d 随机采取根际土样备用,采集方法同 1.2.1.1。

1.2.2.1 土壤脱氢酶活性 参照朱南文等^[9]方法,称取 5 g 土样于带塞试管中,加入 5 mL 5 g/L 氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液、2 mL 0.1 mol/L 葡萄糖溶液,充分振荡,对照以 5 mL 0.2 mol/L Tris · Cl 缓冲液(pH=7.4)代替 TTC,置于 30 °C 暗处培养 12 h 后,加 2 滴浓硫酸终止反应。然后加入 5 mL 甲苯,在摇床上振荡 30 min,静止 3 min,将培养液移入离心管,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上层有机溶液在 492 nm 处比色。酶活性以每克土样中 TTC 的还原产物二苯基甲替(TF)的形成量表示。

1.2.2.2 土壤脲酶活性 采用苯酚钠比色法^[10],称取 5 g 土样于 100 mL 三角瓶中,加入 1 mL 甲苯,摇匀,室温放置 15 min 后,加入 5 mL 10% 尿素和 10 mL pH 值 6.7 的柠檬酸盐缓冲液混匀。将三角

瓶置于 37 ℃ 恒温箱中培养 24 h, 培养结束后于 3 000 r/min 离心 14 min, 吸取 3 mL 上清液注入 50 mL 容量瓶中, 加入 4 mL 苯酚钠溶液和 3 mL 次氯酸钠溶液, 随即摇匀。显色 20 min 后, 用蒸馏水定容, 在分光光度计上于波长 578 nm 处比色测定脲酶的活性。试验中对每一土样设置以水代替基质为对照, 氨态氮含量由脲酶标准曲线求出。脲酶活性以每克干土中含氨态氮(NH₃-N)的毫克数表示。

1.2.2.3 土壤过氧化氢酶活性 采用高锰酸钾法^[11], 称取 5g 土样, 置于 100 mL 三角瓶中, 注入 40 mL 蒸馏水和 5 mL 0.3% H₂O₂。同时设置对照, 即三角瓶中注入 40 mL 蒸馏水和 5 mL 0.3% H₂O₂, 但不加土样。塞紧瓶塞, 置于 120 r/min 摇床上振荡 30 min。随即注入 5 mL 3 mol/L 硫酸以终止反应, 用滤纸过滤后取滤液 25 mL 用 0.05 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至微红色。土壤过氧化氢酶活性以每克土样所用的 0.05 mol/L 高锰酸钾毫升数表示。

表 1 菌株 XG-1 对西瓜根际微生物种群数量的影响

微生物种类	接种后 5 d		接种后 10 d		接种后 20 d	
	处理	对照	处理	对照	处理	对照
真菌/(×10 ⁴ cfu/g)	1.27±0.02b	2.03±0.03a	1.61±0.02b	2.37±0.03a	2.42±0.06b	2.87±0.04a
细菌/(×10 ⁶ cfu/g)	5.76±0.04b	4.17±0.06a	5.02±0.03b	4.43±0.02a	4.83±0.03b	4.43±0.04a
放线菌/(×10 ⁵ cfu/g)	2.21±0.05a	2.46±0.03a	2.52±0.04a	2.57±0.05a	2.69±0.02a	2.74±0.06a

注: 结果为平均值±标准误, 处理和对照数据后不同字母表示同一时间相同微生物种群数量差异显著(P<0.05)。

2.2 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤酶活的影响

2.2.1 土壤脱氢酶活性 从图 1 可看出, 菌株 XG-1 混土接种后对西瓜根际土壤中脱氢酶的影响较小, 处理植株比对照植株的根际酶活稍高, 两者都呈先增后减变化趋势, 20 d 时达到最高峰, 30 d 后变化趋势平缓。

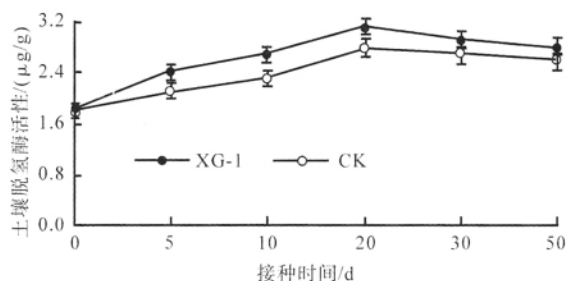


图 1 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤脱氢酶活性的影响

2.2.2 土壤脲酶活性 从图 2 可看出, 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤脲酶有一定的影响, 混土接种后 20 d 内, 处理植株根际土壤脲酶活性低于清水对照, 30 d 后高于对照。

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS Base Ver. 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤微生物群落的影响

从表 1 可以看出, 菌株 XG-1 拌土接种后, 西瓜根际土壤的微生物种群数量发生了变化。处理植株根际土壤中的真菌数量普遍低于对照植株, 随着西瓜植株的生长, 处理植株和对照植株根际土壤中的真菌数量都在增加。菌株 XG-1 接种后, 处理植株根际土壤中细菌的总量明显高于清水对照, 但随着西瓜植株的生长和根系分泌物质的增加, 对照土壤中细菌的数量逐渐增加, 而处理土壤中细菌的数量略有减少。接种后, 西瓜根际土壤中放线菌的数量变化不大, 随着西瓜植株的生长, 处理和对照土壤中放线菌的数量都在增加, 两者间无显著差异。

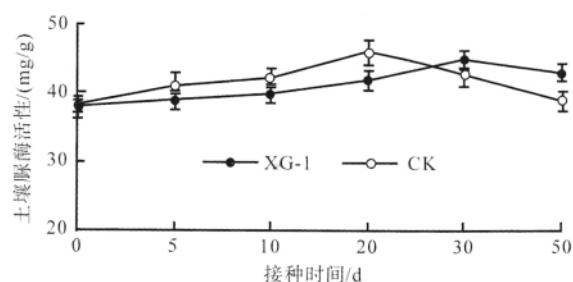


图 2 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤脲酶活性的影响

2.2.3 土壤过氧化氢酶活性 从图 3 可看出, 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤过氧化酶几乎无影响, 处理与对照的酶活曲线变化都比较平稳。

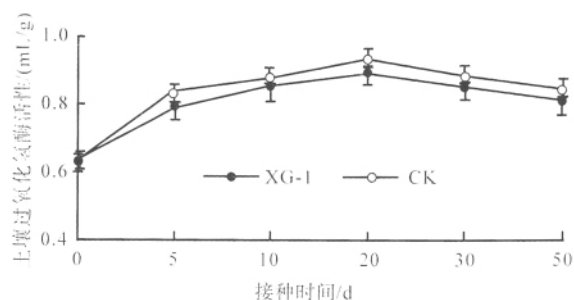


图 3 菌株 XG-1 对西瓜根际土壤过氧化氢酶活性的影响

3 讨论

在植物—微生物—土壤三元关系中,根际微生物作为土壤和植物的中介和桥梁,参与了土壤中几乎所有的物质循环和能量代谢,其活动规律对土壤肥力、植物营养和植物病害具有举足轻重的影响^[12]。郝晓娟等^[13]研究菌株 JK-2 对番茄根际土壤的影响,发现用菌株 JK-2 处理土壤 30 d 后,细菌含量明显高于对照,真菌含量显著低于对照,放线菌含量也有所降低。连玲丽等^[14]研究菌株 EN5 对番茄根围土壤中微生物群体的影响,发现处理初期,细菌、真菌和放线菌的总量均比对照组菌量低,但在接种后 16、28、40 d 时,处理根围土壤中 3 类微生物的数量均比对照土相应微生物数量有不同程度的提高,分析原因为菌株 EN5 的定殖作用可能改变了根围营养结构,促进了根围土壤中微生物的增殖。本研究结果表明,菌株 XG-1 对西瓜根际真菌和细菌的数量影响较大,而放线菌数量几乎无变化。处理初期,细菌数量明显高于清水对照,20 d 后处于持平状态,真菌数量一直低于清水对照。分析原因可能有两点,一方面菌株 XG-1 引入土壤后,与土著真菌相互竞争,争夺生态位及营养物质;另一方面,菌株 XG-1 在土壤中可能产生了某类抑菌物质,不利于真菌生长。

土壤酶作为土壤中具有高度催化功能的蛋白质,主导着土壤中物质和能量转化有关的生化反应,反映了土壤中各种生物化学过程的动向和强度^[15-16]。土壤酶作为土壤肥力水平变化的重要指标,对土壤肥力的形成和提高,土壤生态系统的物质循环等均具有重要的意义^[17]。Mawdsley 等^[18]研究发现,当向土壤中引入外源黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)时,土壤中半乳糖苷酶和葡萄糖苷酶水平也随之发生了变化。张昕等^[19]研究菌株 ZJY-1 及 ZJY-116 对黄瓜根围土壤酶活的影响,结果发现引入两菌株后,与对照相比,土壤中脲酶和过氧化氢酶受影响较小,脱氢酶受影响较大。本研究结果表明,菌株 XG-1 对土壤中不同酶活性影响不同,其中对脲酶影响较大,对过氧化氢酶、脱氢酶影响较小,分析原因可能与引入菌株 XG-1 后,西瓜根际土壤微生物种类和数量的变化有关。

参考文献:

- [1] Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol[J]. New Phytologist, 2003, 157: 493-502.
- [2] Zhang Z, Zhang J, Wang Y. Molecular detection of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. FEMS Microbiol

- Lett, 2005, 249: 39-47.
- [3] Ozaktan H, Bora T. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by the formulations of *Fluorescent pseudomonas*[J]. Journal of Turkish Phytopathology, 2000, 29(23): 133-149.
- [4] Jeun Y C, Park K S, Kim C H, et al. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29: 34-42.
- [5] Newton C, Fagbola O, Smalla K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 3758-3766.
- [6] Nejad P, Johnson P A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oil-seed rape and tomato[J]. Biological Control, 2000, 18: 208-215.
- [7] Parke J L. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms[M]// Keister O L, Cregan P B. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991: 33-42.
- [8] 蒋志强, 郭坚华. 生防菌对土壤微生态影响的风险评估[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 85-88.
- [9] 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.
- [10] 严旭升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1996.
- [11] 周礼恺, 张志明. 土壤酶活性的测定方法[J]. 土壤通报, 1980(5): 37-38.
- [12] Diallo S, Crepin A, Barbey C, et al. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75(3): 351-364.
- [13] 郝晓娟, 刘波, 谢关林, 等. 短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 233-236.
- [14] 连玲丽, 谢荔岩, 陈锦明, 等. 生防菌 EN5 的定殖能力及其对根际土壤微生物类群的影响[J]. 植物保护, 2011, 37(2): 31-35.
- [15] Bolton H J, Elliott 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Mawdsley J L, Burns R G. Inoculation of plants with a *Flavobacterium* species results in altered rhizosphere enzyme activities[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 31: 310-314.
- [19] 张昕, 张立钦, 林海萍, 等. 引入黄瓜根围的 2 株生防菌株的生态效应[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(6): 649-653.