

硅酸盐细菌 NBT 菌株在小麦根际定殖的初步研究*

盛下放

(南京农业大学生命科学院, 南京 210095)

【摘要】 对硅酸盐细菌 NBT 菌株进行了耐药性标记, 得到稳定的链霉素抗性标记菌 NBT 菌株. 采用选择性培养基分离计数, 通过琼脂平板和盆栽试验, 研究了标记菌 NBT 在小麦根际的定殖动态及影响因素. 结果表明, 在灭菌土盆栽中, 播种后 9 d 左右 NBT 菌株在小麦根际的定殖水平达最高 ($1.4 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土), 播种后 54 d 左右趋向稳定, NBT 菌株细胞数量为 $2.4 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土; 未灭菌土盆栽中, 播种后 9 d 左右 NBT 菌株的定殖水平达最高 ($3.8 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土), 60 d 左右趋向稳定, 菌数为 $3.1 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土. 生物和非生物因素对 NBT 菌株定殖小麦根系有影响.

关键词 耐药菌株 小麦根际 定殖动态

文章编号 1001-9332(2003)11-1914-03 **中图分类号** Q938.1 **文献标识码** A

Colonization of silicate bacterium strain NBT in wheat roots. Sheng Xiafang (College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2003, 14(11): 1914~1916.

The strain NBT of silicate bacterium was labelled with streptomycin, and a stable streptomycin resistance strain NBT was obtained. Its colonization dynamics and affecting factors in wheat rhizosphere were studied in agar plates and greenhouse pots were studied by counting the method with selective medium. The results of pot culture experiment showed that strain NBT could successfully colonize in the rhizosphere of wheat. In pot cultures of sterile soil, the highest colonization level ($3.4 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ root soil) was reached on 9th day after seeds sown; at 54th day, the population of strain NBT tended to stable, and decreased to $1.4 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ root soil. In pot cultures of unsterile soil, the highest colonization level ($3.8 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ root soil) was reached at 9th day, and the population of strain NBT tended to a stationary state at 60th day, with the numbers being $1.4 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ root soil. Some biological and abiotic factors could greatly influence the colonization of the beneficial microorganism.

Key words Streptomycin resistance strain, Wheat rhizosphere, Colonizing dynamics.

1 引言

土壤细菌和根圈细菌作为提高农业产量的作物接种剂, 已研究了一个多世纪. 业已证明不同类群的细菌对植物有益, 包括生防菌、植物促生根际细菌 (Plant Growth-promoting Rhizobacteria; 简称 PG-PR)、增产菌以及固氮螺菌 (*Azospirillum* spp.). 但是, 这些细菌必须在根内或根面生长才能对植物生长产生影响. 因此, 它们能否在根部定殖至关重要. 现在, 细菌的根部定殖已成为测量各种细菌-植物系统的一个重要参数, 亦即测量引入细菌的根部定殖已成为揭示有益细菌的根圈微生物学特征、提高其根圈适应性和增产效果必不可少的研究内容. 人们已利用各种检测手段跟踪、检测和回收了各种细菌^[1~4, 8, 10, 11]. 硅酸盐细菌作为一种植物促生根际细菌已受到人们的普遍重视. 这种细菌能通过释放含钾矿物中的钾、硅等元素以及通过产生的植物激素等生理活性物质来促进作物生长、提高作物产量、改善作物品质^[5~7, 9]. 硅酸盐细菌要发挥其功能, 首

先必须能够在作物根部成功地定殖. 然而, 有关硅酸盐细菌在作物根际的存活状况、群体数量的变化以及与环境条件的关系等研究至今未见报道. 由于传统的研究方法难以将引入的细菌菌株与同类土著性细菌分开, 以致研究结果偏差较大. 为此, 本研究采用抗生素标记法, 研究硅酸盐细菌 NBT 菌株在小麦根际的定殖动态及影响因素, 为阐明硅酸盐菌剂的促生机理及科学应用提供科学依据.

2 材料与方法

2.1 供试材料

硅酸盐细菌 NBT 菌株, 由南京农业大学微生物学系分离筛选. 供试作物为小麦 (杨麦-158). 供试土壤为黄棕壤 (采自南京卫岗). 有氮培养基组成 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蔗糖 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.01%, 酵母膏 0.05%, CaCO_3 0.05%, pH 7.4. 无氮

* 上海市农业委员会项目 (农科攻字 (98) 第 05-2 号) 和江苏省教育厅社会发展资助项目 (BS2002044).
2001-01-15 收稿, 2001-04-01 接受.

培养基组成($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蔗糖 1%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, NaCl 0.02%, CaCO_3 0.05%, pH 7.4. 缺钾培养基组成($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 有氮培养基中的 K_2HPO_4 用等量的 Na_2HPO_4 代替; 菌株标记用培养基: 有氮培养基 + 不同浓度(5, 20, 50, 1200, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)的盐酸链霉素。

2.2 耐药菌株的获得^[11]

将 NBT 菌株接种于有氮液体培养基中, 28℃ 振荡培养至对数期的中期(培养时间为 20h), 吸取 1 ml 菌液涂布于含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素的固体有氮培养基上, 置 28℃ 恒温培养 2d. 挑取在平板上出现的菌落至含 $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素的有氮液体培养基内, 28℃ 振荡培养. 当培养基出现混浊时, 再接种至含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素的有氮液体培养基中振荡培养. 以此类推, 最后涂布于含药的有氮培养基平板, 待长出菌落, 挑取并保存于斜面, 由此获得抗 $1200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 链霉素的菌株。

2.3 稳定性试验

稳定性试验的具体方法见文献^[11]. 获得的具有良好抗药稳定性菌株用于以下试验。

2.4 接种物的制备

NBT 菌株接入有氮液体培养基, 28℃ 振荡培养 30 h 后(细胞数量为 2.7×10^8 个 $\cdot \text{ml}^{-1}$)浸泡小麦种子 1 h, 自然凉干, 备用。

2.5 灭菌土和不灭菌土盆栽试验

取黄棕壤过筛(20 目), 加水拌匀, 装钵, 装量为每钵 800g, 126℃ 湿热灭菌 2 h, 冷却后浇无菌水保湿 3~5d 后播种, 每钵播入 10 粒种子, 每隔 3d 浇一次无菌水, 取不同生长时间(1~60 d)的小麦根样检测, 检测方法见文献^[13]. 计数在无氮培养基平板上进行(培养基中添加 $1200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 盐酸链霉素)

2.6 平板试验

接种物种植于琼脂平板内, 待种子生根之后 3~17 d 内定期采样检测细菌在小麦根上定殖数量, 计算 1cm 根段上细菌菌落形成单位 $\text{cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$. 检测与计数方法同 2.5.

2.7 摇瓶试验

500 ml 三角瓶, 每瓶加钾长石粉(100 目)2.0 g 和缺钾培养基 100 ml, 在 121℃ 下灭菌 20min, 然后接入硅酸盐菌剂 5ml. 对照接等量灭活菌液. 试验设 3 个重复, 28℃ 振荡培养 ($200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)5d 后取样分析. 样品处理方法见文献^[6], 钾用原子吸收分光光度法测定。

3 结果与分析

3.1 抗生素抗性标记菌株 NBT 的定殖动态

利用链霉素平板测定 NBT 菌株在小麦根际的定殖密度和动态变化(图 1). 接种 NBT 菌株后即开始增殖(最初接种量为每棵小麦种 $6.4 \times 10^6 \text{cfu}$), 在灭菌土盆栽条件下, 定殖在小麦根际的 NBT 菌株细胞数量在接种后 9 d 左右达最高($1.4 \times 10^8 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土), 54 d 左右趋向稳定, 数量为 $2.4 \times 10^3 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$

根土; 在未灭菌土盆栽条件下, NBT 菌株的定殖数量则在 9 d 左右达最高($3.8 \times 10^8 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土), 60 d 左右即开始趋向稳定, 为 $3.1 \times 10^3 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 根土. 未灭菌条件下达到增殖高峰的时间与灭菌条件下的时间相近, 但未灭菌条件下最大定殖数量高于灭菌条件下, 且未灭菌条件下细胞定殖数量趋向稳定的时间延长, 其原因可能与土著微生物或土壤中其它活性物质对 NBT 菌株生长、繁殖的促进作用。

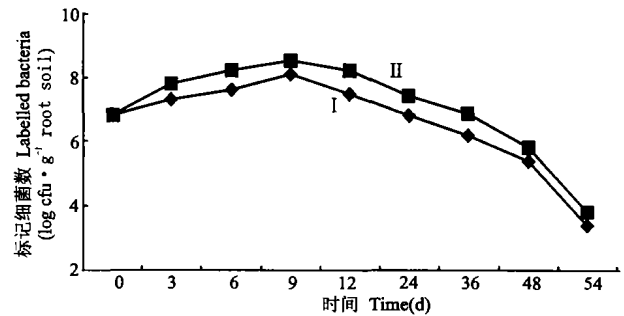


图 1 NBT 菌株在小麦根际定殖的动态变化

Fig. 1 Dynamic variations of NBT colonizing in wheat rhizosphere.

I. 灭菌土 Sterile soil, II. 未灭菌土 Non-sterile soil.

3.2 NBT 菌株在根部定殖的影响因素

3.2.1 水分含量 NBT 菌株定殖小麦根系能力受水分含量影响较大. 在 0.5% 和 1.0% 琼脂平板上, NBT 菌株定殖小麦根系的数量分别为 4.2×10^5 和 $4.5 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$, 显著高于 1.5% 琼脂上的数量 ($1.6 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$); 而 1.5% 琼脂上的细菌定殖数量又显著高于 3.0% 琼脂上的数量 ($7.6 \times 10^4 \text{cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2.2 pH 值 在 NBT 菌株生长适宜 pH 值范围内 (6.5~8.0), NBT 菌株在小麦根系定殖能力受 pH 值的影响不大(表 1).

表 1 pH 值对 NBT 菌株定殖小麦根系的影响*

Table 1 Effect of pH on the colonization of strain NBT on wheat root system ($\log \text{cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$)

| pH | 1d | 3d | 6d | 9d |
|-----|-------|-------|-------|-------|
| 6.5 | 5.14a | 5.25a | 5.36a | 5.30a |
| 7.0 | 5.36a | 5.62a | 5.95a | 5.86a |
| 7.5 | 5.87a | 6.13a | 6.26a | 6.35a |
| 8.0 | 5.74a | 5.85a | 6.15a | 5.92a |

* Duncan's $\alpha=0.05$ Different analysis was Duncan's $\alpha=0.05$.

3.2.3 营养成分 生长于 SA 和 WA 2 种营养条件下, 小麦根上 NBT 菌株定殖数量 4 次检测结果均高于生长在 NA 上的定殖数量. 生长于 HA 营养条件下, 小麦根上 NBT 菌株定殖数量最大, 说明 NBT 菌株在有机氮丰富的条件下不能很好生长; 在小麦最适生长条件下, NBT 菌株细胞能很好生长(表 2).

3.2.4 芽孢杆菌 芽孢杆菌 C3 和 C8 菌株首先定殖小麦根上, 对 NBT 菌株再定殖没有显著影响. 同

时, NBT 菌株在小麦根上定殖的数量并未受后来 C3 和 C8 菌株定殖的影响(表 3)。

表 2 营养成分对 NBT 菌株定殖小麦根系的影响

Table 2 Effect of nutrients on colonization of strain NBT on wheat root system(logcfu·cm⁻¹)

| 营养成分* Nutrients | 1d | 3d | 5d | 7d |
|-----------------|------|------|------|------|
| NA | 6.11 | 6.10 | 6.05 | 5.25 |
| SA | 6.32 | 6.47 | 6.47 | 6.24 |
| WA | 6.24 | 6.15 | 6.21 | 6.10 |
| HA | 7.15 | 7.12 | 6.95 | 6.87 |

* 琼脂浓度均为 1.0% Agar concentration was 1.0% in all plates, NA: 0.2% 营养肉汤琼脂平板 0.2% nutrition of peptone agar plate, SA: 土壤浸出液琼脂平板 Solution of soil agar plate, WA: 琼脂平板 Water-agar plate, HA: Hogland 溶液琼脂平板 Solution of Hogland agar plate.

表 3 芽孢杆菌对 NBT 菌株定殖小麦根系的影响

Table 3 Effect of strain *Bacillus* on the colonization of strain NBT on wheat roots(logcfu·cm⁻¹)

| 处理 Treatment | 定殖数量(NBT) Population densities | 处理 Treatment | 定殖数量(NBT) Population densities |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| C3 + NBT | 4.94 a | NBT + C3 | 5.10 a |
| C8 + NBT | 5.16 a | NBT + C8 | 5.25 a |
| NBT | 5.11 a | NBT | 5.15 a |

3.3 标记菌株的解钾活性

硅酸盐细菌 NBT 菌株在摇瓶条件下表现出较强的分解钾长石的能力(表 4)。培养 5d, 标记菌株可以从钾长石中释放出 89.1 mg·L⁻¹ 钾, 比接灭活菌和不接菌对照分别增加 49.8% 和 732.7%。非标记菌株可以从钾长石中释放出 89.6 mg·L⁻¹ 钾, 说明硅酸盐细菌 NBT 菌株经抗药性标记后, 其解钾活性没有丧失。

表 4 硅酸盐细菌 NBT 菌株的解钾作用

Table 4 K release from feldspar by strain NBT of silicate bacterium

| 处理 Treatment | 培养液中的钾 K in fermented fluid (mg·L ⁻¹) | pH |
|---|---|------|
| 不接菌 No-inoculation | 10.7 | 6.95 |
| 接灭活菌 Inoculation with dead bacteria | 60.5 | 6.56 |
| 接菌 Inoculation with active bacteria | 89.6 | 5.45 |
| 接标记菌 Inoculation with labeled bacteria | 89.1 | 5.48 |
| 接标记灭活菌 Inoculation with labeled dead bacteria | 59.5 | 6.87 |

4 讨 论

有益微生物在根际定殖并在整个植物生长周期保持较多数量的存活, 这是人工接种菌剂能否有效地提高作物产量的重要因素。引入植物根际的微生物的检测方法有 4 种: 天然抗生素抗性的标记, 外来基因标记, DNA 和 RNA 探针以及免疫学方法^[12]。采用天然抗生素抗性作为检测标记具有简便、快速、消耗低、实验结果可以进行统计分析等优点。当菌株没有选择标记时, 天然抗生素抗性就很实用^[13]。虽然这种方法有其局限性, 如土壤本底中抗生素抗性菌株的存在以及抗生素抗性的不稳定性。但在本研究中, 经抗生素平板检测供试土壤中不存在抗盐酸

链霉素(1200 μg·ml⁻¹)菌株; 另外, 本研究采用了无氮培养基作为一种选择培养基, 提高了供试菌株检测的可靠性和准确性。通过无菌和有菌条件下培养和抗生素标记法测定, 表明 NBT 菌株能在小麦根际成功定殖并保持较多数量。NBT 菌株细胞定殖数量的变化都是先快速增殖然后逐渐下降并保持一个较低的相对稳定状态。但是在田间作物整个生长季节以及在不同土壤, 不同作物根际 NBT 菌株存活状况以及它们的主导作用, 值得进一步研究。另外, 可采用基因探针、发光酶基因等研究方法原位检测硅酸盐细菌在作物根际的分布状况、动态变化及其影响因素, 为进一步阐明硅酸盐细菌促生机理及科学应用提供试验依据。

参考文献

- Bai J-L(柏建玲), Wang P(王 平), Hu Z-J(胡正嘉). 1999. Using lux genes marker technique to track *Pseudomonas chlororaphis* PL9L in cotton rhizosphere. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 39(1): 43~48(in Chinese)
- Chabot R, Klopper J. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl Environ Microbiol*, 62(8): 2767~2772
- Hoflich G, Wiehe W, Kuhn G. 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, 50: 897~905
- Kluepfel DA. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann Rev Phytopathol*, 31: 441~472
- Luo W(罗 微), Xie D-T(谢德体), Huang Z-X(黄昭贤). 1998. Role of silicate bacteria in releasing potassium from minerals and soils. *J Southwest Agric Univ*(西南农业大学学报), 20(1): 5~8(in Chinese)
- Sheng X-F(盛下放), Huang W-Y(黄为一), Yin Y-X(殷永娴). 2000. Effects of application of silicate bacterium fertilizer and its potassium release. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), 23(1): 43~46(in Chinese)
- Ullman WJ, Kirchman DL, Welch SA, Vandevivere P. 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chem Geol*, 32(1~4): 11~17
- Wang P(王 平), Wang Q(王 勤), Feng X-M(冯新梅). 1999. Root colonization of non-legume plants by luxAB and GusA genes marked huakuii JS5A16. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), 18(3): 238~241(in Chinese)
- Wang S-Y(王思远). 2000. Effect of the silicate bacterium on absorbing and transforming nutrient of tobacco in soil. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 22(3): 10~15(in Chinese)
- White D, Leifert C, Ryder MH, et al. 1996. Lux gene technology—a strategy to optimize biological control of soil-borne disease. *New Phytologist*, 133: 173~181
- Wu S-C(吴胜春), Li L-M(李良谟), Li Z-G(李振高). 1994. Obtaining streptomycin resistance strain from predominant rhizosphere bacteria and its ¹⁵N label. *Microbiol J*(微生物学通报), 21(4): 195~198(in Chinese)
- Zhang B-X(张炳欣), Zhang P(张 平). 2000. Detection of introduced microorganisms to rhizosphere. *J Zhejiang Univ (Agric and Life Sci)*(浙江大学学报(农业与生命科学版)), 26(6): 624~628(in Chinese)
- Zhang Y-X(张玉勋), Wang D-B(王道本), Peng Y-F(彭于发). 1996. Studies on the colonization of the biocontrol agent D93 strain on wheat roots. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), 15(1): 18~23(in Chinese)

作者简介 盛下放, 男, 1963 年生, 副教授, 博士, 主要从事土壤养分微生物活化及土壤污染微生物治理等研究, 发表学术论文 10 余篇。E-mail: xfshe604@sohu.com