

多功能复合菌剂的构建及盐碱胁迫下促生效果

司欣雨¹, 李佳琪¹, 周梦含¹, 张 曼¹, 胡开蕾², 郭红莲^{1*}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2. 天津萌白生物科技有限公司, 天津 300457)

摘要: 微生物对植物的生长和土壤改良起到重要作用。为改变盐碱土壤不利于作物生长的现状, 该研究对盐碱土壤进行了菌群结构分析, 并分离得到了有促生作用的功能微生物, 利用已有拮抗菌与分离促生菌混合构建一种多功能复合菌剂, 研究在盐碱胁迫下其对绿豆的促生作用。结果表明: 供试土壤中具有特定的微生物群落结构, 其中 SI-1-3 经鉴定为枯草芽孢杆菌属, 具有溶解有机磷和分解钾元素的能力, 能够分泌吡啶乙酸和赤霉素; 酵母菌 Y-2 对镰孢菌等植物病原菌有抑制作用。复合菌剂在盐碱条件下对绿豆生长有明显的促进作用, 且能防止病原菌的侵染, 增强植物的抗逆性, 从而降低植株的发病率。与无菌水对照组相比, 绿豆的出苗率增长了 7.44%, 发病率降低了 82.37%, 处理后的绿豆根长、株高和茎叶鲜质量分别增长了 75.24%、64.33%、66.67%; 绿豆苗的叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白含量分别升高了 71.63%、64.21% 和 77.87%。该复合菌剂对植株具有促生效应, 有望进一步开发成为特定环境下的微生物资源。

关键词: 土壤; 植物; 复合菌剂; 拮抗; 促生; 盐碱胁迫

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202406121

中图分类号: S156.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2024)-21-0082-09

司欣雨, 李佳琪, 周梦含, 等. 多功能复合菌剂的构建及盐碱胁迫下促生效果[J]. 农业工程学报, 2024, 40(21): 82-90.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202406121 <http://www.tcsae.org>

SI Xinyu, LI Jiaqi, ZHOU Menghan, et al. Constructing multifunctional composite microbial agents for promoting crop growth under saline-alkali stress[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2024, 40(21): 82-90. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202406121 <http://www.tcsae.org>

0 引言

土壤盐碱化严重制约了农作物的生长, 影响着农林牧业经济的发展, 因此探索盐碱土壤的改良方法和改进作物耐盐碱胁迫的能力, 对于提高粮食产量、推动农业可持续发展具有重要意义。当前国内外有很多改良盐碱土壤的方法, 大体上可以分为物理调控法、化学改良法和生物手段改良三大类^[1-2]。何宪波等^[3]利用掺入煤矸石法来从组成上改良土壤盐碱性; HOWELL 等^[4]利用生物堆肥复合生物炭来增加根际菌群落结构, 实现改善土壤和促进植物根系生长的目的。生物改良法尤其是微生物菌体的应用以其高效率、低成本和不会造成环境污染等特点而受到广泛的关注。

盐碱土壤中存在特有的微生物菌群结构, 对这些微生物进行有效利用可以为盐碱土壤的生物改良提供有效思路。近年来, 国内外学者先后发现了多种耐盐碱的具有改善盐碱胁迫、促进植物生长作用的微生物: 朱浩等^[5]在黄河三角洲盐碱土壤中筛选得到的极端耐盐碱芽孢杆菌, 盆栽试验证实其显著提高了土壤相关酶的活性, 促进了小麦根系和植株的生长; 张静等^[6]从矿区土壤中

分离得到的硫氧化细菌可以中和盐碱土中的 OH^- , 降低土壤 pH 值。EGAMBERDIEVA 等^[7]发现将假单胞细菌与根瘤菌建立共生, 可以协同促进盐胁迫下大豆的生长。利用这些耐盐碱微生物开发微生物肥料, 将在减轻作物盐碱胁迫, 增加作物产量方面发挥重要作用^[8]。此外, 人们在盐碱土壤中也发现了很多有拮抗病原菌作用的微生物, 其在抵抗病菌侵染、保证作物健康方面具有很好的应用前景^[9-10]。郑中玲等^[11]从盐碱土中分离了多株抗假禾谷镰刀菌的放线菌, 盆栽试验证实对小麦茎基腐病的防效较好; 王蓓等^[12]从甘肃省河西走廊盐碱土中分离到了对植物立枯丝核病有生防效力的放线菌用于土豆病害的防治, 这些抗病菌的发现为土传作物病害的生物防治提供新的菌种资源。

目前, 耐盐碱促生菌与抗病生防菌共混合来探究在盐碱环境下对作物生长的影响尚鲜有报道。针对盐碱作物生长势弱、苗期土传病害严重的问题, 本研究通过两种菌株的混合共培养来探索其在盐碱土壤中的适应性和抗病作用, 以绿豆植物为试验对象, 研究复合菌剂对盐碱植物生长的影响, 以评估复合菌在盐碱条件下的促生和抗病效果, 为开发多功能微生物肥料、改良土壤环境、提高粮食产量和品质提供应用基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品

采集于天津市津南区小站稻种植区 (39°32'0"N,

收稿日期: 2024-06-18 修订日期: 2024-09-02

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技攻关计划 (2022B02030)

作者简介: 司欣雨, 研究方向为农产品贮藏与加工。

Email: 1066550409@qq.com

*通信作者: 郭红莲, 副教授, 研究方向为采后病害生物防治。

Email: guohonglian@tust.edu.cn

117°28'0"E) 盐碱地, 土壤 pH 值为 7.80~8.42, 电导率为 400~1 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 盐分为 0.73~1.33 g/Kg, 有机质为 12.10~31.40 g/kg。采集工具用 75% 乙醇灭菌处理后, 分别以“梅花形 5 点采样法”在两个不同位置取样, 采样深度为 0~20 cm, 每个土样重复取 3 次, 挑出根系等杂物, 装入无菌袋中带回实验室, 分别编号为 HT、YT, 利用四分法混匀, 4℃ 下保存。

1.1.2 试验菌种

指示病原菌: 镰孢菌 (*Fusarium raminearum*)、稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae* Cav): 分离自发病植物并分别保存备用。

拮抗菌 Y-2: 由实验室保存的生防拮抗菌, 使用前活化并用于分子鉴定。

供试菌株 SI-1-3: 以稀释平板法于盐碱土壤样品中分离获得。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA 培养基)^[13]、马铃薯葡萄糖培养基 (PDB 培养基): 用于拮抗菌和指示病原菌的生长;

无机磷培养基、有机磷培养基^[14]: 用于测定菌株溶解无机磷、有机磷的能力;

硅酸盐培养基^[13]: 用于测定菌株分解硅酸盐的能力。

1.2 土壤微生物多样性测定

应用试剂盒纯化 2 种土壤样品基因组 DNA^[15], 纯化后送至上海生物工程有限公司, 采用 Illumina HiSeq 平台进行高通量测序。

1.3 供试菌 SI-1-3 的分离纯化及鉴定

将土壤样品过筛除杂后, 按马晓莉等^[16]研究方法进行梯度稀释。挑取分离频率较高的优势菌株三区划线法得到单菌落后观察菌落形态特征, 重复多次得到优势菌, 标号为 SI-1-3, 革兰氏染色后观察, 并参照徐淑琴等^[17]方法将供试菌 SI-1-3 扩繁后送至上海生工科技公司测序, 在 NCBI 数据库同源性比对。

1.4 供试菌 SI-1-3 的促生性能测定

1.4.1 供试菌 SI-1-3 溶磷、解钾功能测定

参照文献^[18-19]方法, 将菌株点接于有机磷、无机磷及硅酸盐培养基上, 28℃ 恒温箱中培养 48 h。若菌株具备溶磷解钾能力, 则含磷培养基上将出现明显的溶磷圈, 硅酸盐培养基上呈现透明油滴状菌落。

1.4.2 供试菌 SI-1-3 分泌吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) 的测定

定性测定: 采用 Salkowski 比色法^[18]验证菌株分泌吲哚乙酸的能力。

定量测定: 分别将菌株以 1% 的接种量接种于含有色氨酸和不含色氨酸的 PDB 培养基中培养 48 h, 测定 530 nm 波长处吸光度, 以吲哚乙酸作为标准品制作标准曲线, 参照对应的标准曲线计算 IAA 的量^[20]。

1.4.3 供试菌 SI-1-3 分泌赤霉素 (Gibberellin, GA) 的测定

按 1% 的接种量将菌悬液转接到 PDB 培养基中, 28℃ 振荡培养 48 h 后离心, 取 0.5 mL 上清液与 4.5 mL 浓硫

酸充分反应后定容至 20 mL, 测其 412 nm 处的吸光度, 重复 3 次, 根据标准曲线计算赤霉素分泌量^[21]。

1.5 拮抗菌 Y-2 同源序列分析及系统发育树的构建

将活化后的拮抗菌 Y-2 提取基因组 DNA 送至上海生工有限公司进行 ITS 扩增测序, 通过 NCBI 网站的 BLAST 搜索与测序结果相似的序列, 并采用 MEGA 7.0 软件构建菌株的系统发育树。

1.6 拮抗菌 Y-2 的抑菌性能测定

将镰孢菌和稻瘟病菌分别置于 PDA 培养基中 28℃ 培养 3~5 d, 在菌落边缘用直径为 1 cm 的打孔器取菌饼, 移入新的 PDA 平板中间, 距离病原菌中心 1.5 cm 处分别对称接入同样大小的拮抗菌 Y-2 菌落, 置于 28℃ 下培养, 每隔 24 h 测量病原菌菌落的最长直径和最短直径, 并计算抑菌率, 试验重复 3 次。

$$R(\%) = (D-d)/D \times 100\% \quad (1)$$

式中 R 为抑菌率; D 为菌落长直径, cm; d 为菌落短直径, cm。

1.7 复合菌剂的构建及其耐盐碱阈值测定

1.7.1 菌株相容性试验

利用平板交叉划线法检测菌株间的相容性^[22]。分别用接种环蘸取新鲜菌株 SI-1-3 与 Y-2 的菌苔, 于 PDA 平板上交叉划线, 28℃ 培养 48 h 后, 观察各菌株的生长状况。

1.7.2 复合菌剂的制备

用无菌接种环分别蘸取供试菌 SI-1-3 和 Y-2 菌落, 接种至 100 mL PDB 培养基中, 28℃、200 r/min 振荡培养 24 h。参照徐伟慧等^[23]的方法将两菌液按照 1:1 (体积比) 的比例混合, 摇床培养使复合菌液 600 nm 处的吸光度 OD_{600} 值为 0.5, 备用。

1.7.3 复合菌剂耐盐碱阈值测定

耐碱试验: 将 PDB 培养液用 1 mol/L NaOH 调整 pH 值分别为 8.0、8.5、9.0、9.5、10.0, 将培养 48 h 的复合菌液以 1% 的接种量接入上述不同 pH 值的培养液中 28℃、180 r/min 摇培 24 h, 观察其生长状况。

耐盐碱试验: 选择菌株生长最好的适宜 pH 值, 调整培养液 pH 为最适值, 按 1% 的接种量分别接种到 NaCl 浓度 (以质量分数计) 为 1%、3%、5%、7%、9% 的 PDB 培养基中, 于 28℃、180 r/min 振荡培养, 取培养 24 h 的复合菌液于 600 nm 波长下测其吸光度, 每处理重复 3 次。

1.8 盐碱胁迫下复合菌剂对病原菌的离体抑菌效果评估

用无菌涂布棒将同浓度的 SI-1-3、Y-2 菌液及复合菌液均匀涂布至 NaCl 浓度为 5%、pH 值为 8.5 的改良 PDA 平板上, 以涂布等量无菌水为空白对照, 静置待各溶液完全渗入培养基后按 1.6 节方法接入直径为 1 cm 的镰孢菌菌饼, 置 28℃ 下培养, 每组重复处理 3 次, 每天测定各组生长直径, 计算抑菌率。并于第 5 天刮取菌落边缘菌丝和孢子, 于扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 下观察。

$$R(\%) = (m-n)/m \times 100\% \quad (2)$$

式中 m 为空白组病斑直径, cm; n 为试验组病斑直径, cm。

1.9 复合菌剂的活体盆栽效果评价

挑选大小均匀、无霉变的绿豆种子, 蒸馏水浸泡 30 min 后, 依次用 75% 的乙醇和 1% NaClO 消毒 10 min, 再用无菌水清洗 2 次。将处理后的种子预催芽 1 d。

将 YT 土壤高温灭菌后喷施 1 mol/L NaOH 和 5% 的 NaCl 溶液各 200 mL, 等量装入相同花盆中并植入催芽绿豆种子, 每组盆栽分别设置如下 4 个处理: 无菌水; SI-1-3 菌液; Y-2 菌液; 复合菌液, 各菌液浓度均为 $OD_{600}=0.5$, 处理方法为在豆苗附近浇注 10 mL, 置于室温中培养。4 d 后补浇菌剂 1 次, 生长一周后分别测定各组出苗率, 观察根部发病情况并计算发病率及防效^[24]。待绿豆苗长出 6 片叶左右时, 小心挖出绿豆植株并洗净根部泥土, 吸干水分后分别测定各组幼苗的根长、株高及茎叶鲜质量, 参照文献^[24-25]方法分别测定绿豆苗的叶绿素含量、可溶性蛋白含量和可溶性糖含量的测定, 每个处理重复 3 次, 每次 10 株豆苗。

1.10 数据分析

采用 Excel 2023 软件整理数据, 采用 SPSS Statistics 26 和 Origin 2021 软件进行数据的分析和作图, 数据表示为样本平均值±标准偏差 (SD)。

2 结果与分析

2.1 土壤样品高通量测序结果分析

对土壤群落组成和相对丰富度进行分析, 将门水平上相对丰富度占比前 10 的物种绘制成堆积柱状图, 结果如图 1 所示。两个土壤样本微生物群落在细菌多样性和丰富度上存在一定差异, 由 16S 测序结果 (图 1a) 显示, YT 土样细菌群落中变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和放线菌门 (*Actinomycetes*) 为优势菌群, 分别占比 57.43%、23.37%、11.33%。HT 土样中以变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinomycetes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 最多, 分别占比 29.03%、19.13%、9.62%, 优势菌均为变形菌门 (*Proteobacteria*), 其次为放线菌门 (*Actinomycetes*)。YT 和 HT 两个盐碱土壤样本真菌群落都以子囊菌门 (*Ascomycota*) 占比最多 (图 1b), 分别为 91.66% 和 87.01%。

2.2 供试菌 SI-1-3 的鉴定

从两个供试土样中均分离得到了编号为 SI-1-3 的分离频率较高的菌株, 其在 PDA 培养基上生长 48 h 后的菌落形态见图 2a, 菌落边缘粗糙, 表面有褶皱, 污白色或微黄色, 革兰氏染色为阳性, 显微镜下观察到菌体呈杆状, 能形成芽孢 (图 2b)。该菌经 16S rRNA 测序和同源性比对, 发现其与 *Bacillus subtilis* 16-5G (接受号为 KF381492.1) 和 *Bacillus subtilis* HTI 23 (GenBank 接受号为 MK521066.1) 序列同源性为 100%, 与 *Bacillus subtilis* ZG14-8 菌株同源性为 99%。

结合形态学和分子生物学鉴定, 可确定供试菌 SI-1-3

为枯草芽孢杆菌属 (*Bacillus subtilis*) 菌株。枯草芽孢杆菌属于厚壁菌门, 在供试盐碱土样中分离频率较高, 是 YT 土样中丰度排名第二的优势菌。YANG 等^[26]报导了在盐碱土壤中分离得到的厚壁菌门细菌并促进了小麦植株的生长, 本研究分离得到的枯草芽孢杆菌与其结果相似, 后续用来验证促生性并选用 YT 土壤样本为盆栽试验中的供试土壤。

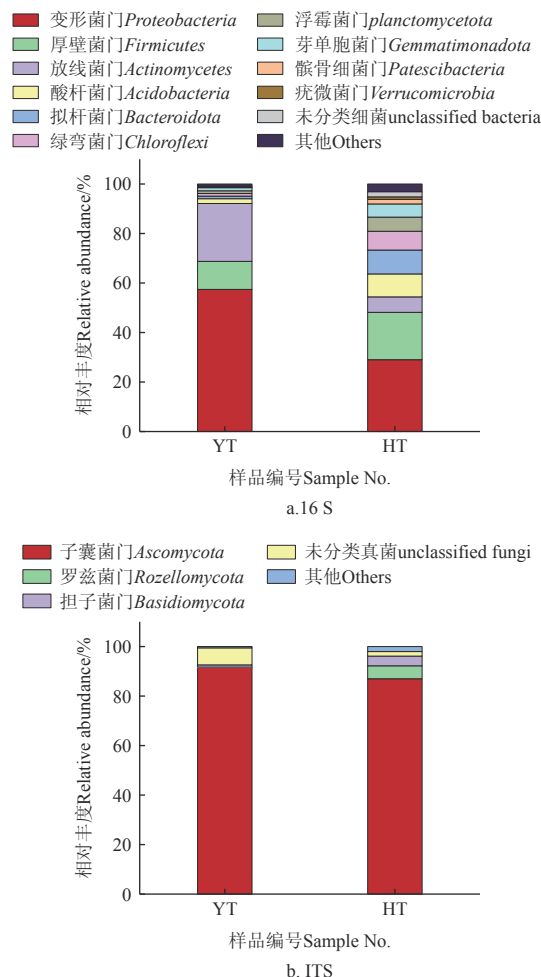


图 1 16S 和 ITS 微生物分类测序相对丰度图
Fig.1 Relative abundance maps of 16S and ITS microbial classification and sequencing

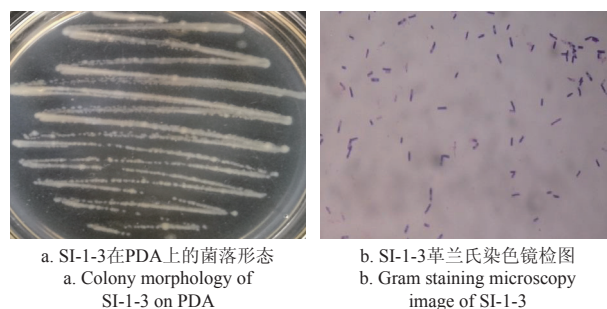


图 2 菌株 SI-1-3 在 PDA 上的菌落形态和革兰氏染色镜检图
Fig.2 Colony morphology of strain SI-1-3 on PDA and Gram staining microscopy image

2.3 供试菌 SI-1-3 促生性能测定

2.3.1 溶磷解钾能力的测定

SI-1-3 在有机磷培养基上出现了明显的溶磷圈 (图 3a),

说明菌株产生的有机酸溶解了菌落周围的有机磷，在无机磷培养基无明显溶磷圈（图 3b），在硅酸盐培养基上形成了表面光滑的透明菌落，说明菌株分解硅酸盐释放了钾元素（图 3c）。此结果表明供试菌株 SI-1-3 在土壤中可分解有机磷、释放钾元素从而有利于植物生长，无机磷可被植物直接吸收，所以土壤微生物分解有机物释放磷、钾元素可促进植物对矿质元素的吸收。

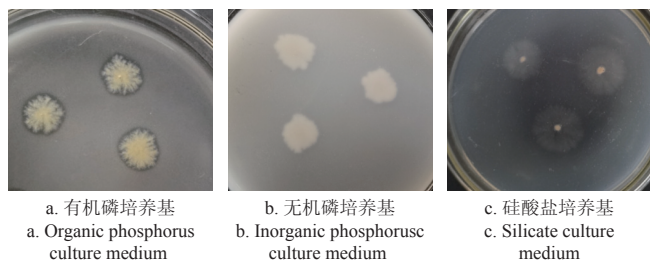


图 3 菌株 SI-1-3 在有机磷、无机磷及硅酸盐培养基上的生长情况

Fig.3 Growth of strain SI-1-3 on organic phosphorus, inorganic phosphorus, and silicate culture media

2.3.2 供试菌 SI-1-3 分泌吲哚乙酸的测定

培养菌上清液加入比色剂显色后颜色改变，而对照组不变色为原本菌液颜色（图 4），表明菌株培养液中存在供试菌 SI-1-3 分泌的吲哚乙酸。吲哚乙酸是重要的植物生长素，按 1.4.2 节方法得到吲哚乙酸的标准曲线 $y = 0.0259x + 0.255$, $R^2 = 0.9956$ ，经计算，在添加色氨酸和未添加色氨酸的情况下菌株 IAA 含量分别为 (73.86 ± 0.01) 、 (50.39 ± 0.07) $\mu\text{g/mL}$ ，这可能与色氨酸作为 IAA 合成的前体物质有关^[27]。

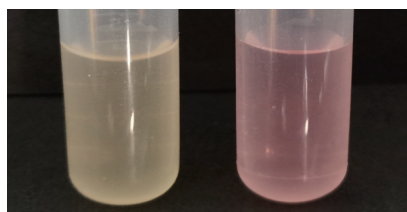


图 4 菌悬液与比色剂的显色结果

Fig.4 Color rendering result of bacterial suspension and colorimetric agent

2.3.3 供试菌 SI-1-3 分泌赤霉素的含量测定

赤霉素是一类非常重要的植物激素，参与植物生长发育等多个生物学过程。按 1.4.3 节方法得到赤霉素的标准曲线 $y = 0.0033x + 0.0002$, $R^2 = 0.9939$ 。测定菌株分泌赤霉素的含量，经计算得到赤霉素分泌量为 (80.55 ± 0.01) $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 拮抗菌 Y-2 同源序列分析及系统发育树的构建

将所得序列结果通过 NCBI 网站的 BLAST 分析，选取相似度较高的序列进行发育树的构建，如图 5 所示，该株拮抗菌与膜醭毕赤酵母菌（*Pichia membranifaciens*）的同源性达 98% 以上，可确定拮抗菌 Y-2 是膜醭毕赤酵母菌属菌株。

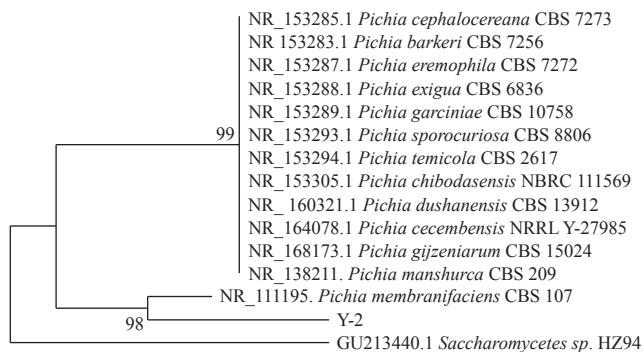


图 5 拮抗菌 Y-2 系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of antagonistic bacteria Y-2

2.5 拮抗菌 Y-2 抑制病原菌的能力测定

稻瘟病菌可引起水稻的严重病害，镰孢菌是能够侵染多种植物（粮食作物、经济作物、药用植物及观赏植物等）的病原菌，两者均为天津市南地区常见的土壤习居菌。离体平板抑菌试验发现病原菌菌落出现了清晰明显的抑菌带（见图 6）。在培养第 3 天时 Y-2 对镰孢菌和稻瘟菌的抑菌率分别为 54.77% 和 43.60%，第 7 天时达到 76.01% 和 73.20%。此结果表明 Y-2 菌株能够明显抑制两种病原菌的生长，有成为盐碱土传病害拮抗菌的应用可能性。

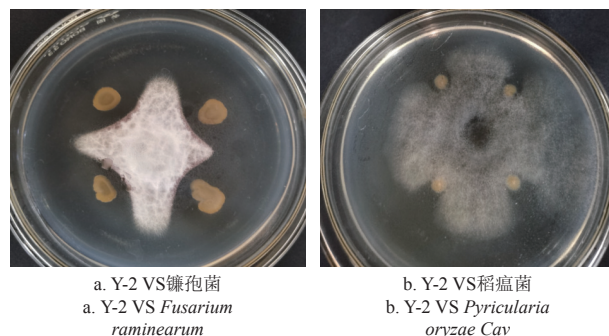


图 6 对峙生长第 7 天时拮抗菌 Y-2 对病原菌的抑制情况

Fig.6 The inhibiting of antagonistic bacterium Y-2 to pathogenesis at the 7th day

2.6 复合菌剂相容性

菌株 SI-1-3 与 Y-2 在 PDA 平板上生长状态见图 7，两菌之间有良好的相容性，菌落接触层互不影响，无拮抗现象，因此可以共培养配制成复合菌剂。



图 7 菌株间相容性检测

Fig.7 Compatibility testing between strains

2.7 复合菌剂耐盐碱能力测定

耐碱试验表明，复合菌在 pH 值为 8.0 和 8.5 的培养液中正常生长，大于 8.5 时菌株长势减弱，说明 pH 值

为 8.5 的碱性条件已对复合菌株形成胁迫。耐盐试验表明, 复合菌对盐度有较强的适应性, 在 NaCl 浓度为 1%~5% 范围内时吸光度值保持稳定, 但在 7%~9% 范围内吸光度值逐渐下降, 说明 5% 为最适盐度, 超过 5% 时菌株活性下降 (图 8)。因此, 后续试验选用 NaCl 浓度为 5%、pH 值为 8.5 环境作为盐碱胁迫条件, 用以测定复合菌剂的应用效力。

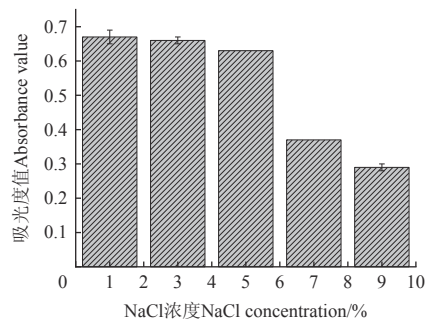
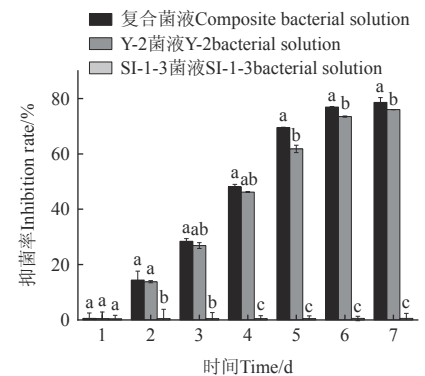


图 8 不同盐度对复合菌生长的影响
Fig.8 The effect of different NaCl concentrations on the growth of composite bacteria

2.8 盐碱胁迫下复合菌剂对病原菌的离体抑菌效果评估
镰孢菌为土壤常见习居菌, 在盐碱土植物根部病害中极为常见, 在盐碱条件下的平板抑菌结果见图 9。菌株 SI-1-3 单独培养对镰孢菌无明显抑菌效果, 培养 2 d 后复合菌和拮抗菌 Y-2 的抑菌率随时间的增加而逐渐增加, 复合菌剂对镰孢菌的抑制效果在 5 d 后明显高于 Y-2 ($P<0.05$), 在第 7 天时对镰孢菌的抑菌率可达 78.4%, 这表明两种混合菌共培养可能存在一定的协同效应, SI-1-3 增加了拮抗菌 Y-2 的生防抑制效果。



注: 同列相同字母表示各系列处理组无差异, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: The same letter in the same column indicates no difference in treatment groups of each series, while different letters indicate significant differences.

图 9 菌株 SI-1-3、Y-2 及复合菌剂对镰孢菌的抑制情况
Fig.9 Inhibition of *Fusarium raminearum* by strains SI-1-3, Y-2 and composite microbial agent

培养 5 d 时镰孢菌菌丝和孢子形态如图 10 所示, 无菌水处理的镰孢菌正常生长, 孢子形似镰刀且表面平整光滑, 菌丝粗壮饱满, 而复合菌剂处理后的镰孢菌孢子出现褶皱, 菌丝干瘪畸形。

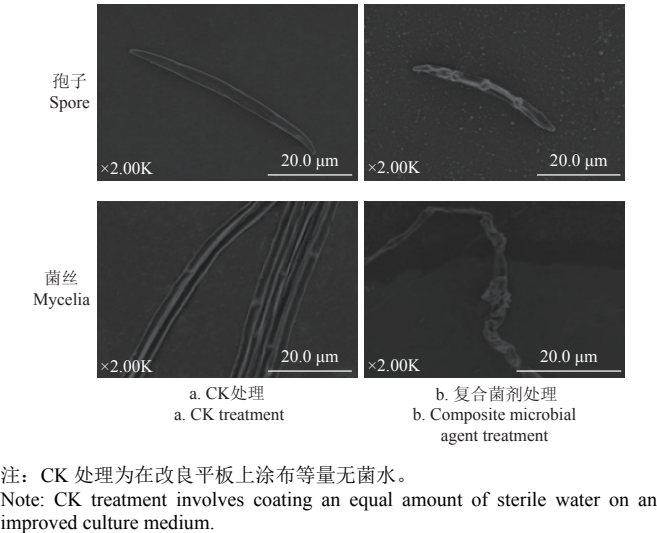


图 10 扫描电镜下镰孢菌孢子和菌丝形态图
Fig.10 Morphology diagram of *F. raminearum* spores and mycelia under SEM

复合菌的协同抑菌效应为发现盐碱植物土传病害的生防菌提供了新思路, 相容性强的两种菌混合可能协同抑菌, 增加拮抗菌的抑菌性。共培养混合菌通过破坏病原菌的菌丝和孢子形态而抑制其正常生长。

2.9 复合菌剂的盆栽效果评价
2.9.1 不同处理对绿豆种子出苗和发病的影响
绿豆种子出苗和根系发病情况见表 1。复合菌剂处理组的种子出苗率为 93.44%, 显著高于 CK 组和 SI-1-3 单独处理组 ($P<0.05$)。复合组植株根腐病防效为 82.34%, 显著小于两种单一菌株处理后的发病率 ($P<0.05$)。上述结果表明复合菌剂处理在促进出苗和减少根腐病方面都有一定的协同作用, 在盐碱土壤中生长的植株出苗率增加, 根腐病发病率减少与 2.8 节中离体效果试验结果是一致的。

表 1 不同处理对绿豆出苗和发病的影响			
Table 1 Effects of different treatments on the emergence and disease incidence of mung beans			
处理 Treatments	出苗率 Emergence rate	发病率 Incidence rate	防效 Control effect
CK	86.97±1.16 ^a	45.56±1.63 ^c	—
SI-1-3	90.57±0.60 ^b	41.82±0.33 ^c	8.21±0.05 ^a
Y-2	88.14±0.21 ^{ab}	16.90±0.36 ^b	62.88±0.01 ^b
复合菌剂	93.44±1.78 ^c	8.03±0.33 ^a	82.34±0.01 ^c

注: 采用最小显著性差异法进行多重比较, 同列小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。
Note: The least significant difference method was used to perform multiple comparisons, where lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). Same below.

2.9.2 不同处理对绿豆幼苗生长及生理指标的影响
从生长形态上来看, 试验组的绿豆苗相较于空白组表现出一定的生长优势。如表 2 所示, 复合菌剂处理组根长和株高分别为 (3.61±0.59)、(7.51±0.72) cm, 较 CK 组平均增加了 75.24% 和 64.33%, 与单一菌剂处理组相比也表现出显著的差异 ($P<0.05$)。

表 2 不同处理对绿豆植株生长的影响
Table 2 Effects of different treatments on the growth of mung bean plants

处理 Treatments	根长 Root length/cm	株高 Plant height/cm	茎叶鲜质量 Fresh weight of stem and leaf/g
CK	2.06±0.21 ^a	4.57±0.41 ^a	0.18±0.06 ^a
Y-2	2.13±0.99 ^{ab}	4.59±1.14 ^a	0.19±0.06 ^a
SI-1-3	2.83±0.67 ^b	6.39±1.29 ^b	0.23±0.03 ^b
复合菌剂	3.61±0.59 ^c	7.51±0.72 ^c	0.30±0.90 ^c

绿豆苗的部分渗透胁迫性物质含量测定结果见表 3 复合菌剂在盐碱土条件下可有效促进绿豆苗的生长发育。复合组的绿豆苗茎叶鲜质量高于单一菌剂处理组，可能是接种复合菌剂提高了绿豆苗的生物量积累增加了其鲜质量。复合菌剂处理组的绿豆苗渗透胁迫物质含量显著高于其单一菌剂和空白组 ($P<0.05$)，而两组单一菌剂处理的渗透胁迫物质含量高于空白组 (见表 3)，说明单独接种两株菌种均能在一定程度上改善盐碱植物物质代谢，而两种菌混合可能存在协同作用，在促进生长，抵抗病害侵染方面共同起作用，使绿豆植株的营养状况得到了改善，提高了其抗逆性和细胞内容物含量，生长效果更好。

表 3 不同处理对绿豆植株生理指标的影响
Table 3 Effects of different treatments on physiological indicators of mung bean plants

处理 Treatments	叶绿素 Chlorophyll/ (mg·L ⁻¹)	可溶性糖 Soluble sugar/%	可溶性蛋白 Soluble protein/ (mg·g ⁻¹)
CK	2.89±0.08 ^a	1.90±0.03 ^a	1.22±0.16 ^a
Y-2	2.94±0.20 ^{ab}	2.31±0.06 ^b	1.68±0.04 ^{ab}
SI-1-3	3.66±0.17 ^b	2.39±0.06 ^b	1.85±0.06 ^b
复合菌剂	4.96±0.07 ^c	3.12±0.04 ^c	2.17±0.07 ^c

3 讨 论

天津市南区盐碱土地面积占比大，作物受盐碱胁迫导致成活率低和生长势弱，通常情况下作物产量较低。本研究对天津市南区盐碱土壤的群落结构分析发现的厚壁菌门优势菌株 SI-1-3 属枯草芽孢杆菌，具有分泌吡啶乙酸和赤霉素的能力，在一定程度上促进植物生长。DURAIRA 等^[28] 研究平流层芽孢杆菌被证明可以促进人参植物生长；ANASTASIO 等^[27] 也报道了枯草芽孢杆菌 MBI600 通过促进植物生长而被强调为一种生物控制剂。因此，某些芽孢杆菌可作为盐碱土壤中的促生菌。土壤微生物是土壤能量循环主要参与者，施用微生物菌肥等措施增加盐碱土壤中功能微生物的数量或种类^[29-30]；尚辉等^[31] 研究新围垦海涂盐土地区土壤微生物群落改良前后数量明显存在差异，说明除芽孢杆菌外可能存在其他对植物有促生作用的菌株。

拮抗菌膜醭酵母 Y-2 为自然界存在的生防菌，属微生物分类中的放线菌属，已证实其对多种植物病原菌有拮抗作用^[32-33]。本研究验证了 Y-2 酵母菌对土壤常见病原菌的抑制作用，并且可以与枯草芽孢杆菌混合共培养，在盐碱环境中仍保持其抑菌活性，这为拮抗菌在盐碱土

壤中的应用提供了理论参考。在盐碱土壤中增加原有功能菌的数量或引入新的功能微生物，对于盐碱地作物的健康生长将发挥重要的作用。

本研究相容性试验表明促生菌枯草芽孢杆菌及拮抗酵母菌可以共同培养，并且在盐碱条件下除了发挥各自的促生和拮抗作用之外，两者混合培养时存在着协同效应，增加了原有的促生作用和抑菌性。本复合菌剂构建的目的是实现盐碱环境下保证植株的健康生长，鉴于绿豆为盐碱土壤中种植较多的植物，生育期短，并且种子出苗后无颖壳包被，有利于调查根系病害，因此只针对育种周期短的绿豆进行了促生和抑制根腐病测定。复合菌剂处理的绿豆出苗率较高且出苗时间也较早，其根腐发病率降低了 82.37%，这得益于复合菌间的协同作用，大大增加了拮抗菌的生防效果；两种菌混合处理绿豆苗的叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白含量分别升高了 71.63%、64.21%、77.87%，在盐碱环境下植物的抗性增强，其长势以及渗透胁迫性物质含量处于较高水平。

混合菌种的促生机制除了菌种促生效果的叠加之外，还可能导致植株长势的显著提升，植株叶绿素、细胞蛋白和可溶性糖的含量增加使植株能够更有效地抵抗病原菌的侵害。此外，促生菌分泌的某些物质可能通过促进拮抗菌的生长和繁殖来增强植物对病原菌的防御能力^[34]，这种机制丰富了混合菌种对植物促生和防御的多重影响。本文对所构建的复合菌剂进行了初步研究，其在复杂的田间环境下的应用效果以及对其他作物的促生机制还有待进一步研究，未来可以通过进一步的研究和优化，开发出更高效、应用更广泛的复合菌剂，为盐碱地治理和农业可持续发展提供有力支持。

4 结 论

1) 从盐碱土壤中分离鉴定出有促生作用的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SI-1-3。该菌能够溶解有机磷、分解钾元素，具有良好的元素转化性能，分泌吡啶乙酸和赤霉素的含量分别为 (73.86± 0.01)、(80.55± 0.01) μg/mL。

2) 拮抗菌 Y-2 属膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*)，在盐碱条件下对镰孢菌有抑制作用，培养第 7 天时抑菌率为 76.01%。与供试菌 SI-1-3 有较好的相容性，能够共培养发挥协同和促进作用。

3) 枯草芽孢杆菌和拮抗酵母共同培养构建了具有促生-抑菌多功能的复合菌剂。复合菌剂在 NaCl 浓度为 5%、pH 值为 8.5 的盐碱环境下仍能保持稳定活性，且对土传病害有较强的抑制作用。复合菌剂处理后的绿豆根长、株高和茎叶鲜质量涨幅分别为 75.24%、64.33%、66.67%。与单一菌剂相比，复合菌剂在促进植物生长、提高抗逆性、改善出苗率和降低发病率等方面具有显著优势。

[参 考 文 献]

[1] 杨劲松, 姚荣江, 王相平, 等. 中国盐渍土研究: 历程、现状与展望[J]. 土壤学报, 2022, 59(1): 10-27.

- YANG Jinsong, YAO Rongjiang, WANG Xiangping, et al. Research on salt-affected soils in China: History, status quo and prospect[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(1): 10-27. (in Chinese with English abstract)
- [2] SUN Z W, GE J M, LI C, et al. Enhanced improvement of soda saline-alkali soil by in-situ formation of super-stable mineralization structure based on CaFe layered double hydroxide and its large-scale application[J]. *Chemosphere*, 2022, 300: 134543.
- [3] 何宪波, 乔俊, 李紫薇, 等. 煤矸石改良盐碱土对马铃薯生长的影响[J]. *农业工程学报*, 2023, 39(14): 145-154.
HE Xianbo, QIAO Jun, LI Ziwei, et al. Effects of improved saline-alkaline soil with coal gangue on potato growth[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(Transactions of the CSAE)*, 2023, 39(14): 145-154. (in Chinese with English abstract)
- [4] HOWELL C, JENKINS N S, ABBOTT K L, et al. Amelioration of a saline - alkaline soil using biochar and compost: Impacts on plant growth, soil biological and chemical characteristics[J]. *Land Degradation Development*, 2023, 35(1): 142-155.
- [5] 朱浩, 刘珂欣, 刘维维, 等. 极端耐盐碱菌株的筛选及其菌肥对盐碱条件下小麦生长和土壤环境的影响[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(7): 2338-2344.
ZHU Hao, LIU Kexin, LIU Weiwei, et al. Screening of extreme salt-alkali tolerant strain and effect of its fertilizer on wheat growth and soil environment under saline-alkali condition[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology (Earth Science Edition)*, 2019, 30(7): 2338-2344. (in Chinese with English abstract)
- [6] 张静, 王清, 李晓茹, 等. 利用硫氧化细菌改良盐碱土[J]. *吉林大学学报 (地球科学版)*, 2009, 39(1): 147-151.
ZHANG Jing, WANG Qing, LI Xiaoru, et al. Research on improving the saline-solic soil by sulfur-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Jilin University (Earth Science Edition)*, 2009, 39(1): 147-151. (in Chinese with English abstract)
- [7] EGAMBERDIEVA D, WIRTH S, JABBOR D, et al. Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture[J]. *Journal of Plant Interaction*, 2017, 12: 100-107.
- [8] JOSHI G, KUMAR V, BRAHMACHARI S K. Screening and identification of novel halotolerant bacterial strains and assessment for insoluble phosphate solubilization and IAA production[J]. *Bulletin of the National Research Centre*, 2021, 45(1): 1-8.
- [9] HAMED J, MOHAMOD P F, VENROS A. Systematic and biotechnological aspects of X halophilic and halotolerant actinomycetes[J]. *Extremophiles*, 2013, 17(1): 1-13.
- [10] MAGARONI F D O, MARIANA G D S, SUELIT V D S. Antiphytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent[J]. *Research in Microbiology*, 2010, 161(7): 565-572.
- [11] 郑中玲. 河南省小麦茎基腐病发生因素分析及其防治研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2020: 24-32.
ZHENG Zhongling. Study on the Occurrence Factors and Control of Wheat Stem-Based Rot in Henan Province[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2020: 24-32. (in Chinese with English abstract)
- [12] 王蓓, 牛世全, 达文燕, 等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. *生物技术通报*, 2014(1): 156-160.
WANG Bei, NIU Shiquan, DA Wenyan, et al. Screening of actinomycetes on antagonism to *Rhizoctonia solani* isolated from saline-alkali soils in Hexi corridor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(1): 156-160. (in Chinese with English abstract)
- [13] 焦有宙, 高赞, 李刚, 等. 不同土著菌及其复合菌对玉米秸秆降解的影响[J]. *农业工程学报*, 2015, 31(23): 201-207.
JIAO Youzhou, GAO Zan, LI Gang, et al. Effect of different indigenous microorganisms and its composite microbes on degradation of corn straw[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(Transactions of the CSAE)*, 2015, 31(23): 201-207. (in Chinese with English abstract)
- [14] 王艳宇, 向君亮, 周妍, 等. 耐盐碱细菌 DQSA1 的分离鉴定及盐碱胁迫下对绿豆的促生作用[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2653-2664.
WANG Yanyu, XIANG Junliang, ZHOU Yan, et al. Isolation and identification of saline-alkali tolerance bacteria DQSA1 and its growth-promoting effect on mung bean under saline-alkali stress[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2653-2664. (in Chinese with English abstract)
- [15] 雷高, 李珊珊, 李亮亮, 等. 基于高通量测序分析不同地区魔芋根际土壤细菌群落多样性[J]. *中国酿造*, 2023, 42(11): 99-103.
LEI Gao, LI Shanshan, LI Liangliang, et al. Diversity analysis of bacterial community of konjac rhizosphere soil from different regions based on high-throughput sequencing[J]. *China Brewing*, 2023, 42(11): 99-103. (in Chinese with English abstract)
- [16] 马晓莉, 丁范范, 魏纪元, 等. 宁北盐碱地土壤微生物的分离和抗菌活性筛选[J]. *生物学杂志*, 2024, 41(4): 50 - 56.
MA Xiaoli, DING Fanfan, WEI Jiyuan, et al. Extraction and antibacterial activity screening of soil microbes from saline-alkali soil of northern ningxia[J]. *Journal of Biology*, 2024, 41(4): 50- 56. (in Chinese with English abstract)
- [17] 徐淑琴, 马祥兆, 陈晓慧, 等. 藏羊源枯草芽孢杆菌的分离鉴定与生物学特性[J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(12): 5-11.
XU Shuqin, MA Xiangzhao, CHEN Xiaohui, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus subtilis* from tibetan sheep[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(12): 5-11. (in Chinese with English abstract)
- [18] SAHEEWAL H, SANADHYA S, UPADHYAY K S, et al.

- Polyphasic characterization of indigenous potassium-solubilizing bacteria and its efficacy studies on maize[J]. *Agronomy*, 2023, 13(7): 1919.
- [19] 漫静, 唐波, 邓波, 等. 羊草根际促生菌的分离筛选及促生作用研究[J]. *草业学报*, 2021, 30(1): 59-71.
- MAN Jing, TANG Bo, DENG Bo, et al. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *leymus chinensis*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(1): 59-71. (in Chinese with English abstract)
- [20] CHRASTIL J. Colorimetric estimation of indole-3-acetic-acid[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 134-138.
- [21] LAI SE, MYO M, KHAING Z O, et al. Study on gibberellin and gibberellin-like substances from endophytes and their effect on maize plants[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2024, 55: 102979.
- [22] 胡展, 付祖姣, 郭照辉, 等. 复合微生物菌剂对水稻稻瘟病的生防效应[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(2): 483-493.
- HU Zhan, FU Zujiao, GUO Zhaohui, et al. Biocontrol effect of a composite microbial agent on rice blast[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(2): 483-493. (in Chinese with English abstract)
- [23] 徐伟慧, 吕智航, 史一然, 等. 西瓜复合根际促生菌剂构建与促生效应研究[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(5): 778-786.
- XU Weihui, LV Zhihang, SHI Yiran, et al. Construction and growth promoting effects of a composite rhizosphere growth promoting agent for watermelon[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(5): 778-786. (in Chinese with English abstract)
- [24] 彭启超, 张志鹏, 黄德龙, 等. 贝莱斯芽孢杆菌微胶囊制备及其防治番茄枯萎病的应用评价[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(8): 152-155.
- PENG Qichao, ZHANG Zhipeng, HUANG Dehong, et al. Preparation of *Bacillus velezensis* microcapsules and its application evaluation on the control of *Fusarium wilt* of tomato [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, 51(8): 152-155. (in Chinese with English abstract)
- [25] 萧珣, 王兴亚, 张守梅, 等. 外源贝莱斯芽孢杆菌对玉米种芽萌发·幼苗生长与光合系统的影响[J]. *安徽农业科学*, 2024, 52(7): 36-40.
- XIAO Xun, WANG Xingya, ZHANG Shoumei, et al. Effect of exogenous *Bacillus velezensis* on seed germination and seedling growth and photosynthetic system of maize[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2024, 52(7): 36-40. (in Chinese with English abstract)
- [26] YANG J, LI W, TENG D, et al. Metagenomic insights into microbial community structure, function, and salt adaptation in saline soils of arid land, China[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2183.
- [27] ANASTASIOS S, NATHALIE K, GEORGIOS T, et al. Root transcriptional and metabolic dynamics induced by the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Bacillus subtilis* Mbi600 on cucumber plants[J]. *Plants*, 2022, 11(9): 1218.
- [28] DURAIRA J K, VELMURUGAN P, PARK J, et al. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against panax ginseng root rot fungal phytopathogens[J]. *Biological Control*, 2018, 125: 138-146.
- [29] 毕银丽, 江彬, 秦芳玲, 等. 干旱半干旱煤矿区联合接菌对土壤改良动态生态效应[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(7): 85-93.
- BI Yinli, JIANG Bin, QIN Fangling, et al. Effects of combined inoculation microbes on soil dynamic improvement in coal mining subsidence areas[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2021, 37(7): 85-93. (in Chinese with English abstract)
- [30] 张豪, 李哲, 郭凯, 等. 高产 IAA 绿色木霉工程菌株的构建及其应用[J]. *科学技术与工程*, 2022, 22(20): 8623-8631.
- ZHANG Hao, LI Zhe, GUO Kai, et al. Construction and application of engineering strains of *Trichoderma viride* with high IAA yield[J]. *Science Technology and Engineering*, 2022, 22(20): 8623--8631. (in Chinese with English abstract)
- [31] 尚辉, 颜安, 韩瑞, 等. 微生物改良基质对新围垦海涂盐土改良的初步研究[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(8): 120-126.
- SHANG Hui, YAN An, HAN Rui, et al. Preliminary study on the effect of microbial amendment on saline soils in a coastal reclaimed area[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2020, 36(8): 120-126. (in Chinese with English abstract)
- [32] GUO H L, CUI Y, ZHU EL, et al. Effect of antagonistic yeast *Pichia membranaefaciens* on black spot decay of postharvest broccoli[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015(143): 373-383.
- [33] 闫晨卉. 含拮抗菌复合膜的制备及其应用效果研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022: 31-47.
- YAN Chenhui. Study on Preparation and Application Effect of Composite Film Containing Antagonistic Bacteria[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2022: 31-47. (in Chinese with English abstract)
- [34] RAHIMI D, SADEGHI A, KASHANINEJAD M, et al. Postbiotic characterization of a potential probiotic yeast isolate, and its microencapsulation in alginate beads coated layer-by-layer with chitosan[J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): e28452.

Constructing multifunctional composite microbial agents for promoting crop growth under saline-alkali stress

SI Xinyu¹, LI Jiaqi¹, ZHOU Menghan¹, ZHANG Man¹, HU Kailei², GUO Honglian¹✉

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Mengbai Biotechnology Co.Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Crops are often subjected to low survival rates in saline-alkali soil, due to the saline-alkali stress. The increasing number or variety of functional microorganisms in the saline-alkali soil can be expected to significantly promote the growth of plants. In this study, the microbial community structure of saline-alkali soil was analyzed to isolate the functional microorganisms with the growth-promoting using high-throughput sequencing. A multifunctional composite microbial agent was constructed to mix the existing antagonistic bacteria with the isolated growth-promoting bacteria. A systematic investigation was made to clarify the growth-promoting on the mung beans under saline-alkali stress. Two strains were identified by molecular biology. The phosphorus and potassium solubilization of strain SI-1-3 were verified by culture media. The Salkowski colorimetric technique was used to determine the production of the IAA (indole-3-acetic acid) product. Spectrophotometry was used to identify the secretion of GA (gibberellin). The inhibitory capability of antagonistic Y-2 against pathogenic bacteria was determined using the petri dish confrontation. The compatibility experiment among strains was conducted for the composite microbial formulation in a petri dish using the cross-line method. The saline-alkali conditions of the tested soil in the pot experiment were determined to measure the saline-alkali tolerance range of the composite microbial agent. Pot experiments were used to clarify the effects of compound strains on the emergence rate, incidence rate, growth indicators, and physiological and biochemical indicators of mung beans. The growth promotion was verified for the composite microbial agent. The results showed that Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes were the dominant bacterial communities in the soil samples, while Ascomycota shared the highest proportion of fungal communities. A bacterium named SI-1-3 was isolated with a higher isolation frequency from the dominant strains. It was identified as *Bacillus subtilis*, with the ability to dissolve organic phosphorus, decompose potassium elements, and secrete indole-3-acetic acid and gibberellin. According to the phylogenetic tree, the antagonistic strain Y-2 was *Pichia membranifaciens*. Plate experiments showed that antagonistic bacterium Y-2 shared a significant inhibitory effect on *Fusarium raminearum* and *Pyricularia oryzae* Cav. There was no antagonistic effect between the two strains through compatibility tests. They were co-cultured to construct a composite microbial formulation with a volume ratio of 1:1. The saline-alkali tolerance of the composite bacterial agent was identified to determine the best growth of the strain in the PDB medium. Therefore, a pH value of 8.5 and NaCl concentration of 5% were selected as the saline-alkali stress conditions for the subsequent experiments. The mung beans were then planted in the saline-alkali soil with the composite microbial agent. There was a certain promoting effect of composite microbial agent on the growth of mung beans under saline-alkali stress conditions with pH 8.5 and NaCl concentration of 5%. The emergence rate of mung bean increased by 7.44% in the pot experiment, whereas, the incidence rate decreased by 82.37%, compared with the control group. Additionally, the root length, plant height, and fresh weight of stem and leaf that were treated by the composite microbial agent increased by 75.24%, 64.33%, and 66.67%, respectively. At the same time, the chlorophyll, soluble sugar, and soluble protein content of mung bean seedlings increased by 71.63%, 64.21%, and 77.87%, respectively. There was the promoting effect of composite microbial agents on the plants. Thus, the finding can provide an effective microbial resource to improve the saline-alkali land and agricultural development.

Keywords: soils; plant; composite microbial agent; antagonism; growth-promoting; saline-alkali stress