

微生物肥料科学研究中几个热点问题

连宾, 臧金平, 袁生

(南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 微生物肥料作为一项新的农业措施, 在提供绿色食品、保护农业生态环境以及发展高产、优质、高效农业中的作用已引起国内外学者的普遍重视。为促进我国微生物肥料基础和应用基础研究, 作者提出微生物肥料科学研究中值得深入探讨的几个热点问题, 如开展寡糖在植物生长中的调节功能与利用研究, 应用微生物学与 PGPR 理论来促进微生物肥料产业的发展, 把微生物肥料产业的发展与资源有效利用、环境保护和食品安全等相联系。

[关键词] 微生物肥料, 寡糖, 微生物学, 资源利用

[中图分类号] Q939.9, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)02-0065-05

0 引言

施用微生物肥料作为一项新的农业措施, 在提供绿色食品、保护农业生态环境以及发展高产、优质、高效农业中的作用已引起国内外学者的普遍重视^[1]。微生物肥料由传统的根瘤菌接种剂发展到自生固氮菌、磷细菌、硅酸盐细菌、固氮绿藻肥料以及“5406”抗生菌肥料等, 此后又出现应用内、外生菌根菌肥料以及由多种有益微生物和有机物复合制成的复合生物肥料, 当然现有多种制作微生物肥料的有效菌种本身并不是肥料, 只有在植物根部定植形成优势菌落时, 才能发挥其生物屏障、改善植物营养条件及满足植物生长所必需养分(及其它条件)的功能^[2]。事实上, 增加作物的产量并不是微生物肥料的惟一衡量指标, 促长、抗病和改善作物品质也应该是微生物肥料的功能, 作为废物处理中的发酵剂、增温剂产品, 只要其最终产品是肥料也应属于广义微生物肥料的范畴。随着科学研究的深入, 用多学科的方法和思路来研究微生物肥料的作用机理及增强其功能已经成为微生物肥料科学研究的主要趋势, 生物肥料科学与微生物学、土壤化学、微生物学、植物病理学、基因工程和农业生物工程等学科融合渗透派生出许多新的研究方向, 如研究寡糖在植物生长中的调节功能, 通过有效手段调动植物自身的防御系统来对付病原菌的侵害, 利用微生物代谢产物如活菌增长因子来促进作物生长, 固氮结瘤因子的研究与利用以及基于近代微生态学理论发展起来的植物根际促生细菌(PGPR)的作用研究等。作者认为有必要采用全新的理论和方法, 从不同的角度来研究微生物肥料, 以促进本学科的发展并有望藉此推动该行业的产业化进程。

本文就微生物肥料科学研究中的几个热点问题进行讨论。

1 寡糖在植物生长中的调节功能研究

寡糖在植物体内及植物与微生物间的相互作用中发挥重要作用。来源于植物和病原体细胞壁的寡聚糖均具有激发植物抗性反应的活性, 可作为激发子诱导植物细胞发生抗性反应, 寡聚糖信号被植物细胞识别后, 可迅速引起质膜去极化、离子通道开放、胞外培养基碱化等瞬间反应, 还可通过硬脂酸代谢途径合成茉莉酸等信号分子, 诱导相关抗性基因的表达。在植物的抗病机制中, 植物在受到微生物感染或诱导物(elicitor)处理后就会合成并积累抗微生物的植保素(phytoalexin), 如大豆疫霉感染大豆时, 病原体细胞壁上的寡糖可被大豆苗各器官细胞膜上的专一性受体识别并以非共价键结合, 诱导大豆苗积累植物防御素^[3]。据报道 1g 七糖可以使几百吨正在生长的植物产生足够的抵御病原菌侵害的植保素^[4]。许多真菌的细胞壁和无脊椎动物的外骨骼中所含结构组成几丁质和脱乙酰几丁质(chitosan)中的寡糖片断也能在多种植物中诱发抗病反应。可能的机制是: 植物本身的几丁质酶, 将感染的真菌或无脊椎动物病原体细胞壁或外骨

收稿日期: 2003-12-20.

基金项目: 中国博士后基金资助项目(2003033496), 南京师范大学基金资助项目(184070H2B39)。

作者简介: 连宾, 1964- , 博士, 南京师范大学生命科学学院教授, 主要从事微生物学的研究, E-mail: bin2368@vip.163.com

髓中的几丁质或脱乙酰几丁质降解为至少由 4 个 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖或脱乙酰化的残基构成的寡糖片断,某些特定的寡糖片断能够象“抗原”一样激活植物的防御系统,并诱发其产生植保素.也就是说只要通过有效手段调动植物自身的防御系统,植物本身就可以合成一些“生物农药”来对付病原菌的侵害^[5,6].由于寡糖具有调节植物细胞生理活性及改善作物品质的功能,因而可与微生物肥料共同应用于植物的生长过程中.

根瘤菌与豆科植物共生的信息分子固氮结瘤因子即 lipo-chitin-oligosaccharides 也是一种寡聚糖,它是由根瘤菌产生的一种信号分子,在根瘤形成过程中起着十分重要的作用^[7,8].所有的结瘤因子均含 β -乙酰氨基葡萄糖残基构成的骨架(通常为四糖或五糖).在其氨基葡萄糖残基的非还原性末端 N-脂酰基取代了 N-乙酰基,不同来源的结瘤因子在还原乙酰氨基葡萄糖残基 C-6 位修饰不同.Nod 基因的突变研究表明,根瘤菌结瘤因子的众多结构特征是它们的生物活性和宿主专一性所要求的.新近的研究表明^[9,10],在细菌与植物相互作用过程中,结瘤因子的有益作用主要包括以下几方面:① 诱导新根毛的形成;② 诱导结瘤基因的启动;③ 诱导根毛变形及弯曲;④ 细胞膜势能的去极化;⑤ 根部皮层中根瘤分生组织的形成;⑥ 侵染线的生成等.有资料证明^[11-13],某些结瘤因子不仅对豆科作物有效,在促进非豆科作物种子发芽和植株生长方面也有一定的功效,从而使结瘤因子的应用范围扩大,前景也更为诱人.近几年,固氮结瘤因子大分子骨架不同侧链基因对结瘤因子在生物固氮作用过程中的影响、固氮结瘤因子的基因分析及克隆、固氮结瘤作用过程中结瘤因子对宿主植物生理代谢变化的影响以及固氮结瘤因子的诱导等已有许多报道^[9,10,12].利用有效的诱导剂诱导根瘤菌产生较高浓度的结瘤因子,并试图用以提高作物产量(主要是豆科作物)的研究已经开始并取得进展^[8,14].

微生物生长代谢产物对植物促长作用的研究表明^[15],豆科、桔梗科一些植物含有刺激细胞分裂、促进细胞生长的增长因子.实验证明在细菌肥料的生产中应用增长因子,可以提高产品活菌数,降低生产成本^[15].

2 微生物生态学理论和植物根际促生细菌(PGPR)作用的研究与应用

土壤-植物系统中存在植物与植物、微生物与微生物、植物与微生物以及土壤生物与环境之间的相互作用(图 1),在这些相互作用中根际微区域是物质和能量交换十分频繁的一个界面^[16,17],微生物积极参与了这个微生态系统中的能量和物质的循环过程,并成为其中非常活跃的一个组分.它们的代谢活动不但影响植物的生长和发育,而且也是影响土壤和大气之间气态物质交换的一个不可忽视的因素.陈廷伟^[2]借鉴医学上微生态调节剂的理论并与农业中根际细菌的作用进行比对,把植物的根系比做动物的肠胃(它们都是吸收营养的器官,只是一个在体内,一个在体外),认为

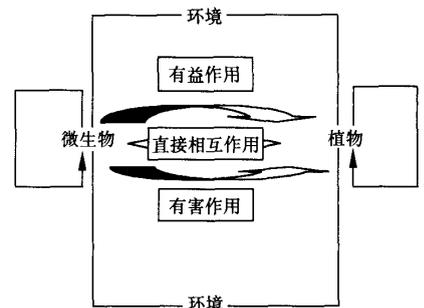


图 1 根际微生物、植物与环境之间的相互作用

人和动物的微生物生态学中有关生态平衡与肠道正常菌丛和菌丛失调的概念,也适用于植物根际微生物失衡问题.根际微生物与植物的相互作用(图 1)可以因为接种大量优势有益细菌于农作物根际而起到调节生态平衡的作用,在植物根际形成一个生物屏障,阻止有害菌的定植和入侵,促进有益菌群对作物生长的复合有益功能(包括促生、防病、固氮、解磷等作用)的发挥.

PGPR 的作用机理和理论根据是基于近代微生物学的发展,其作用机制曾解释为产生生长素、抑制病原菌生长、根际固氮和分解含磷化合物等.显然,PGPR 的作用不是单一的,接种大量优势有益细菌于农作物根际之所以有促进生长作用应是 PGPR 综合作用的结果.PGPR 类微生物可直接间接地对根际微生态环境中营养元素的循环产生影响,微生物的活动可释放或活化某些营养元素,直接地增加根际营养物质的有效性、加快循环过程,同时也可通过影响根系的生长和发育,间接地影响养分的循环过程及其有效性^[17,18].根据 PGPR 理论,微生物肥料的增产作用以 PGPR 的综合效应解释比用传统的固氮、解磷和解钾作用解释更为妥当^[2,19,20],事实上一些具有解钾、溶磷和固氮作用的微生物如硅酸盐细菌已经被认定为 PGPR^[20].

在深入研究微生物与植物的相互作用机理的基础上,应用微生态学与 PGPR 理论来促进微生物肥料产业的发展已成为当前的重要研究方向。

3 有机食品生产、资源再生利用与微生物肥料生产相结合的研究

自上世纪 80 年代以来,粮食、蔬菜和水果等种植业由于大量使用农药、化肥和除草剂,给生态平衡带来明显的和潜在的公共危害,“人类通过这种所谓现代农业文明,无时无刻不在给自己服毒”,而频频发生的“食品公害事件”更加剧了人们“我们还能吃什么”的担忧^[21]。大量使用化肥,特别是氮肥,使将近 60% ~ 70% 的氮进入环境,汇集到湖泊、水库、河流,造成水体的富营养化,一旦疏漏到地下,还会污染地下水,同时又破坏土壤的团粒结构,使之板结、沙化,引起水土流失。土壤污染的另一后果是破坏土壤中的生物多样性,由于大量使用化肥和农药,导致土壤养分不平衡,农田及水域受污染,致使土壤肥力下降,化肥利用率降低,自然环境恶化,威胁人类的生存和发展。目前发达国家都把发展有机农业确定为农业发展的主流方向,而微生物肥料正是其中不可缺少的组成部分。

在人增地减的情况下,粮食的增加必须通过提高单产来解决,这使得化肥在粮食生产中的作用越来越重要。但我国资源有限的远景状况十分令人担忧^[23]。以磷肥和钾肥为例,在目前国内加工能力较小的情况下,磷矿石的供应基本能满足市场需求,并有少量出口,但国内磷肥供应有相当部分尚需依赖进口;我国钾矿原料不能自给,钾盐供应长期短缺,只得依赖进口^[21-23]。当今农业生产目标主要是:不断提高作物单位面积产量,合理利用自然资源,改善农业生态环境,保持和提高土壤肥力^[24]。利用我国丰富的有机废弃物资源制作微生物肥料是当前微生物肥料重点研究的内容之一,其原理是利用其中的有机物质和有益微生物来改善土壤肥力,达到废物处理和利用的双重目的,符合生态农业发展方向^[25,26]。

化石资源是有限的,但许多生物资源是可以再生的,在人类的生产实践中充分利用各种可再生生物资源具有十分重要的意义。这里以外生菌根菌肥料为例来做进一步地说明。内生菌根菌是真菌与高等植物的根部形成的菌根联合体,由于菌根结构是长期协同进化的结果,一些尚未明确的生态条件、营养方式以及子实体分化发育的条件使得包括块菌、美味牛肝菌在内的许多内生菌根类食用菌的人工驯化工作十分艰难^[27,28]。中国有极为丰富的内生菌根菌资源,如伞菌类中的红菇属、乳菇属、鹅膏菌属、牛肝菌属、腹菌类的硬皮马勃菌属以及子囊菌类的块菌属等^[29,30]。目前在温室条件下菌根植物已被成功移植在有菌环境中^[31,32]。菌根真菌与树根形成共生体,可以显著影响树木在污染土壤中的生长,并减少树根对重金属的吸收,此外接种固氮细菌和菌根能促进可持续发展系统的建立和废弃矿山的修复与重建^[33]。大量报道证明^[34-36],内生菌根菌有利于在贫瘠土壤中生长出茂盛树林,在低营养土壤环境中,内生菌根菌的感染力仍然较强,使大部分植物有了共同的开拓者。中国林业科学院花小梅^[37]采用彩色豆马勃作为共生菌种,在促进苗木生长方面取得成效。现在内生菌根菌肥料的开发包括两方面的内容,其一是让有选择的优良食用菌根菌的扩大培养物与造林树种形成菌根,并促进苗木生长;其二是形成菌根后的菌丝体经过较长时间的生长,在适宜条件下产生子实体。实现第一个目标就可以达到促进苗木生长,提高造林成活率的目的;如果两个目标同时实现,就可以在获得大量速生树的同时,也获得了比木材价值更高的菌类,可谓一举两得。从理论上讲,利用菌根菌不仅可大大提高绿化造林的综合效益,对我国西部山区退耕还林还草和保护其脆弱的生态环境同样具有重要参考价值^[38]。

4 结论

本文所涉及活性寡聚糖和根际微生物促长因子等均属于生物分子的范畴。为与传统微生物肥料有所区别,笔者称此为生物分子肥料。它是常规微生物肥料产品的升级,主要指由微生物产生的促进作物生长的寡聚糖和活性肽类分子物质,将它应用于农业生产中可有刺激作物生长、改善作物品质和抵抗病原菌入侵等作用,从而促进农作物的增产。微生物肥料在农业生产中的应用效果已得到肯定,但有些微生物肥料的作用机理并不十分明确,因此需要加大植物与微生物(特别是 PGPR 类)之间的相互作用机理方面的研究。开展微生物生长代谢产物(寡聚糖和活性生长因子)对植物生长和免疫作用的研究有望了解微生物促进作物生长的作用本质并可能最终在生产中得以应用。从资源再生利用的角度来研究和开发微生物肥料则对资源综合利用和环境保护更具有现实意义。把微生物肥料生产与有机食品和中药材种植业相结合

将推动我国微生物肥料产业化进程,进而有利于微生物肥料科学研究.我们有理由相信微生物肥料科学的研究与应用将为人类的生产和生活带来更多的直接利益.

[参考文献]

- [1] 王素英,陶光灿,谢光辉,等.我国微生物肥料应用研究进展[J].中国农业大学学报,2003,8(1):14—18.
- [2] 陈廷伟.我国微生物肥料发展趋势[A].葛诚.微生物肥料的生产应用及其发展[C].北京:中国农业科技出版社,1996.40—44.
- [3] 金城,张树政.糖生物学与糖工程的兴起与前景[J].生物工程进展,1995,15(3):12—17.
- [4] 张树政,主编.糖生物学与糖生物功能[M].北京:清华大学出版社,2002.149—161.
- [5] Lian B, Zhou X M, Miransari M, *et al.* Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings[J]. *J Agronomy & Crop Science*, 2000, 185: 187—192.
- [6] Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, *et al.* Systemic Acquired Resistance[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1809—1819.
- [7] Nakakuki T. Development of functional oligosaccharides in Japan[J]. *Trends Glycosci Glyc*, 2003, 15: 57—64.
- [8] 连宾,刘丛强,Smith D L. 固氮结瘤信号分子 lipo-chito-oligosaccharides 的研究进展(英文)[J]. *云南植物研究*, 2002, 24(3): 321—332.
- [9] Spaink H P. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1996, 15: 559—582.
- [10] Denarié J, Debelle F, Promé J C. Rhizobium lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis[J]. *Ann Rev Biochem*, 1996, 65: 503—535.
- [11] Koizumi S. Large-scale production of oligosaccharides using bacterial functions[J]. *Trends Glycosci Glyc*, 2003, 15: 65—74.
- [12] Lian B, Souleimanov A, Zhou X M, *et al.* In vitro induction of lipo-chitin-oligosaccharides production in *Bradyrhizobium japonicum* cultures by root extracts[J]. *Microbiological Research*, 2002, 157(3): 157—160.
- [13] Lian B, Prithiviraj B, Souleimanov A, *et al.* Evidence for the production of chemical compounds analogous to nod factor by silicate bacteria GY92[J]. *Microbiological Research*, 2001, 156(3): 289—292.
- [14] Stacey G, Carlson R W, Spaink H. Pentasaccharide phytohormones and methods for their use[P]. Patent Application: US 92822925 920121; Priority: US 91771356 911004; CAN 121:104372 AN 1994: 504372.
- [15] 魏铁麒,沙长青,吴皓琼,等.细菌肥料活菌发酵增长因子的研究[J].生物技术,1997,7(5):31—33.
- [16] 旷远文,温达志,钟传文,等.根系分泌物及其在植物修复中的作用[J].植物生态学报,2003,27(5):709—717.
- [17] 王敬国.微生物与根际中物质的循环[J].北京农业大学学报,1993,19(4):98—105.
- [18] Guo J H, Qi H Y, Guo Y H, *et al.* Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Biol Control*, 2004, 29(1): 66—72.
- [19] Vessey J K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers[J]. *Plant Soil*, 2003, 255: 571—586.
- [20] 连宾.硅酸盐细菌的解钾作用研究[M].贵阳:贵州科技出版社,1998.95—102.
- [21] 季学明.有机农业的生产与管理[M].上海:上海教育出版社,2002.1—82.
- [22] 张雷.我国可持续发展的矿产资源基础[J].自然资源学报,1998,13(2):133—138.
- [23] 戴志新,徐茂.江苏省土壤钾素平衡与解决缺钾的途径[J].南京农业大学学报,1995,18(4):67—70.
- [24] 杨绍斌,肖利萍,钟显亮.微生物肥料的若干基本问题的探讨[J].辽宁工程技术大学学报(自然科学版),2002,21(2): 252—254.
- [25] 连宾,周正乾,杨秀军,等.利用生活垃圾制造有机复合肥研究报告[J].西南农业学报,1994,12(7):40—45.
- [26] 连宾.城乡有机废物农业利用的理论分析[J].贵州科学,1997,15(1):39—45.
- [27] 谭著明,傅绍春,周小玲,等.菌根性食用菌栽培研究进展[J].食用菌学报,2003,10(3):56—63.
- [28] Alexopoulos C J, Blackwell M, Mims C W, 著.姚一建,李玉主,译.菌物学概论(第四版)[M].北京:中国农业出版社,2002.452—474.
- [29] He S C, Lian B, Zhang L. Ectomycorrhizal Fungi Associated With Forest Trees In Guizhou Province, China[A]. Australian Centre for International Agricultural Research. Mycorrhizas for Plantation forestry in Asia: Proceedings of an international symposium and workshop, Kaiping, Guangdong Province, P R China[C]. Canberra: ACIAR Proceedings, 1995, 21—30.
- [30] 刘培贵,王向华,于富强,等.中国大型高等真菌生物多样性的关键类群[J].云南植物研究,2003,25(3):285—296.
- [31] 严东辉,姚一建.菌物在森林生态系统中的功能和作用研究进展[J].植物生态学报,2003,27(2):143—150.
- [32] Jonsson T, Kokalj S, Finlay R, *et al.* Ectomycorrhizal community structure in a limed spruce forest[J]. *Mycol Res*, 2003, 103: 501—508.
- [33] Kahle H. Response of roots of trees to heavy metals[J]. *Environ Exper Bot*, 1993, 33: 109—119.

- [34] Cumming J R. Phosphate-limitation physiology in ectomycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings[J]. *Tree Physiol*, 1996, 16 (11—12):977—983.
- [35] Harvey L M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi[J]. *Biotechnol Adv*, 1991, 9(1):13—29.
- [36] 杨新美,主编. 中国菌物学传承与开拓[M]. 北京:中国农业出版社,2001. 277—282.
- [37] 花小梅. 菌根应用新技术[M].北京:科学普及出版社,1999.1—20.
- [38] 王茂胜,连宾. 美味牛肝菌研究[J].*贵州林业科技*,2003,31(3):34—38.

Several Hot Problems Analysis of Microbiological Fertilizer Research

Lian Bin, Zang Jinping, Yuan Sheng

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract: The microbiological fertilizer (MF) possesses special fertilizer effect that can help plants to gain nutrition from environment. With the development of MF, many kinds of MF are different from traditional MF or inoculants and are used widely in the agricultural practice in China, especially in the economical crops planting by organic agricultural manipulation. Some hot problems related to MF in the research and application are given in this paper, such as oligosaccharides research and application, micro-ecology theory and PGPR (plant growth promoting bacterial) used in the respect of promoting crop growth. The authors emphasize that MF development could be connected with food safety, environment protection and organic living refuse treatment.

Key words: microbiological fertilizer, oligosaccharides, micro-ecology, resource utilization

[责任编辑:孙德泉]

(上接第 64 页)

[参考文献]

- [1] Alexandre A, Shvartsburg A A. DMSO complexes of trivalent metal ions: first microsolvated trications outside of group 3[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124:12343—12351.
- [2] Kobayashi S, Manabe K. Development of novel lewis acid catalysts for selective organic reactions in aqueous media[J]. *Acc Chem Res*, 2002, 35:209—217.
- [3] Martinek K, Klyachko N L, Kabanov A V, *et al.* Micellar enzymology: its relation to membranology[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 981:161—172.
- [4] 李严, 张英华, 王琛, 等. 磷脂酶 A₂ 水解卵磷脂研究的新方法[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2003, 26:44—46.
- [5] Jing Fei, An Xueqin, Shen Weiguo. The characteristics of hydrolysis of triolein catalyzed by wheat germ lipase in water-in-oil microemulsions[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 24:53.
- [6] 安学勤, 王涛, 沈伟国. 微乳液体系中过硫酸钾氧化碘离子的动力学研究[J]. *化学学报*, 2002, 60:980—984.

[责任编辑:孙德泉]