

桔秆降解菌的筛选及其特征分析

程林, 王宗亚, 黄双双, 邬洪艳, 李瑞超

(皖江工学院水利工程学院 安徽马鞍山 243011)

摘要:本研究筛选出高效快速降解桔秆的菌剂,为桔秆还田肥料化提供理论依据。采用富集培养的方式,从160株桔秆降解菌中筛选确定优势菌株XJ-132。对XJ-132菌株分泌物及纤维素酶活性测定,并探讨其对植物病原菌的抗性及种子萌发的影响,进一步解析其对病原菌的拮抗作用及对黄瓜(津研4号)的促生作用机制。结果表明,水稻桔秆接种XJ-132菌株液态发酵35 d后,能明显促进水稻桔秆的降解作用,降解率达58.00%。通过测定菌株产纤维素酶的能力,发现随着培养时间的延长,菌株XJ-132的半纤维素酶与纤维素酶活性均呈先升高后降低的趋势。半纤维素酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶、外切- β -1,4-葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶活性最大值分别为32.53、329.68、493.55、4.90 U·mL⁻¹。细菌侵染试验表明,XJ-132菌株对土传病害具有一定的抑制作用,且对香蕉枯萎病病菌的抑制效果最好,菌圈抑制率达49.30%。16s rDNA基因序列的同源性对比结果显示,XJ-132菌株与枯草芽孢杆菌的序列同源性高达99.93%。进一步分析XJ-132菌株的分泌物质组成,发现有铁载体和吲哚乙酸产生,并具有产氨和产HCN的能力。低浓度XJ-132菌株发酵液对黄瓜种子萌发有促进作用,与喷施清水的对照相比,菌液浓度为10⁸ CFU·mL⁻¹时,种子萌发率显著提高4.66百分点。综上,菌株XJ-132具有较高的纤维素酶活性,不仅能快速降解水稻桔秆,同时具有良好的抑菌能力,而且可以促进黄瓜种子萌发。本文对桔秆降解菌的分离、筛选和鉴定,为我国桔秆资源充分利用提供了理论依据。

关键词:黄瓜;纤维素降解;桔秆降解菌;拮抗菌;种子萌发

中图分类号:S642.2

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2025)11-105-09

Screening and characteristics analysis of straw-degrading bacteria

CHENG Lin, WANG Zongya, HUANG Shuangshuang, WU Hongyan, LI Ruichao

(School of Hydraulic Engineering, Wanjiang University of Technology, Ma' anshan 243011, Anhui, China)

Abstract: In order to screen out the microbial agents that efficiently and rapidly degrade straw, and provide a theoretical basis for the fertilization of straw returning to the field. The dominant strain XJ-132 was screened from 160 straw-degrading bacteria by enrichment culture. The antagonism of XJ-132 strain and the mechanism of plant growth-promoting action on cucumber (Jinyan No. 4) were studied by measuring the secretion and cellulase activity of XJ-132 strain, as well as its resistance to plant pathogens and seed germination. The results showed that the degradation rate of rice straw was 58.00% after 35 days of liquid fermentation of XJ-132 strain, which could significantly promote the degradation of rice straw. By measuring the cellulase production ability of the strain, it was found that the hemicellulase and cellulase activities of strain XJ-132 increased first and then decreased with the extension of culture time. The maximum activities of hemicellulase, endo- β -1,4-glucanase, exon- β -1,4-glucanase and β -glucosidase were 32.53, 329.68, 493.55 and 4.90 U·mL⁻¹, respectively. Bacterial infection experiments showed that XJ-132 strain had a certain inhibitory effect on soil-borne diseases, and had the best inhibitory effect on *Fusarium* wilt of banana, with a bacterium inhibition rate of 49.30%. The homology of 16s rDNA sequence analysis showed that XJ-132 strain had 99.93% homology with *Bacillus subtilis*. Further analysis was carried out that the secreted material composition of XJ-132 strain included the production of siderophore and indole-acetic acid, and had the ability to produce ammonia and HCN. In addition, the low concentration of XJ-132 strain fermentation broth had a promoting effect on seed germination, compared with CK, when the concentration of the bacterial liquid was 10⁸ CFU·mL⁻¹, the seed germination rate increased significantly by 4.66 percentage points. In conclusion, strain XJ-132 had high cellulase activity, which could not only rapidly degrade rice straw, but also had good antibacterial ability, and could promote seed germination. Through the isolation, screening and identification of straw-degrading bacteria, this paper provides a theoretical basis for the full utilization of straw resources in China.

Key words: Cucumber; Cellulose degradation; Straw degrading bacteria; Antagonistic bacteria; Seed germination

收稿日期:2024-08-19;修回日期:2024-12-12

基金项目:安徽省自然科学基金项目(2508085QC110);安徽省教育厅重点项目(2022AH052438)

作者简介:程林,男,讲师,研究方向为植物生理与养分高效利用。E-mail:1550708563@qq.com

农作物秸秆降解能增加土壤有机质含量,改善土壤理化性质,提高土壤微生物种群丰度^[1-2]。研究表明,作物秸秆中C、O、N及固定碳含量分别为41.29%、36.36%、0.66%和16.47%^[3]。因此,农作物秸秆作为肥料还田是实现农业废弃物资源化利用的重要途径^[4]。但秸秆中富含半纤维素、纤维素和木质素等高分子聚合物官能团结构复杂,性质稳定,不易降解,在自然条件下分解缓慢^[5-6]。微生物能有效促进秸秆快速降解,是实现秸秆资源化利用的有效途径^[7-8]。人类利用微生物降解农作物秸秆具有悠久的历史,国内外关于秸秆降解菌的筛选及利用方面的研究也较为广泛^[9-10]。目前发现真菌、细菌和放线菌均具有降解秸秆的能力,并且在水稻、小麦和玉米秸秆中均筛选到高效秸秆降解菌^[11-13]。

目前接种菌株降解秸秆时仅仅只是将具有降解功能的各种微生物简单组合,但微生物通常不是独自存在的,而是与其他无数微生物一起聚集成一个复杂的生物群落,形成庞大的生态相互作用网^[10,14-15]。此外,秸秆降解不是某个微生物个体的作用,无论是秸秆降解细菌还是真菌,均难以单独完成秸秆分解的复杂过程^[16]。秸秆一般携带大量病菌,如果秸秆降解不彻底不仅会造成土壤肥力下降,影响后茬作物生长,还提供病原菌来源,加重作物病害的发生^[17]。接种高效秸秆降解菌,促进秸秆快速降解,一些病原菌会随着秸秆降解而死亡,能大大减少病害的初侵染来源,可以减轻作物病害的发生^[18-19]。因此,对秸秆降解菌进行研究时,不仅需要考虑降解速率,还要考虑不同菌株间以及与土著菌之间是否存在促进或抑制的相互作用,这为探究秸秆降解菌对土壤病原菌的拮抗作用提供了新的思路。柳焕章等^[20]从定性、定量、机制和应用方面综述了微生物间拮抗作用研究的方法、特点及其在农业中的应用,明确了秸秆降解菌对秸秆的快速降解、生物防病和土壤改良具有重要意义。

笔者筛选优势秸秆降解菌并鉴定,测定对不同种枯萎病病原菌的拮抗能力—抑菌率,检测拮抗菌株分泌物及其对黄瓜种子萌发的影响,以期为秸秆降解提供优质菌种资源,同时为促进秸秆快速降解还田、菌株生防效果研究和我国秸秆资源充分利用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 菌源土壤和无病害、霉变的水稻

秸秆均于2020年10月取自安徽农业大学农业园秸秆还田普通土壤,土壤类型为黄褐土,取样后存放于密封袋中并封口,4℃冷藏备用。供试秸秆为水稻两优华6,将秸秆在流动自来水下清洗干净后,于65℃烘箱烘干,剪成2~3 cm长段备用。

1.1.2 供试作物 供试黄瓜品种为津研4号,系天津市农业科学院黄瓜研究所育成的新一代杂交种,购于安徽省农业科学院。

1.1.3 供试菌株 黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Foc*)、西瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fon*)、生姜枯萎病(*Fusarium wilt*)、香蕉枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder et Hasen)等病原菌均由农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室提供。

1.1.4 供试培养基及试剂 LB培养基(1 L):蛋白胨10.0 g, NaCl 10.0 g, 酵母膏5.0 g, pH 7.4; PDA培养基(1 L):去皮马铃薯200.0 g, 葡萄糖20.0 g, pH 7.0; 纤维素-刚果红分离培养基(1 L):羧甲基纤维素钠(CMC-Na)2.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.5 g, 刚果红0.4 g, 琼脂20 g, pH 7.0。上述3种培养基121℃灭菌30 min, 所用试剂均为分析纯^[21]。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离、初筛 称取新鲜的土壤样品10 g至250 mL锥形瓶,加入90 mL无菌水,室温下振荡30 min,即为10⁻¹ g·mL⁻¹的土壤悬液。另取装有4.5 mL无菌水的试管多支,编号10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴。将装有10⁻¹ g·mL⁻¹的土壤悬液三角瓶放在漩涡振荡器上间歇振荡,混匀,移液枪吸取10⁻¹ g·mL⁻¹的土壤悬液0.5 mL,加入编号为10⁻²的无菌水试管中后,再次将试管放在漩涡振荡器上同上振荡均匀,即为10⁻² g·mL⁻¹的土壤悬液。同法可制成10⁻³ g·mL⁻¹和10⁻⁴ g·mL⁻¹的土壤悬液^[18]。移液枪分别吸取10⁻² g·mL⁻¹、10⁻³ g·mL⁻¹和10⁻⁴ g·mL⁻¹的土壤悬液0.1 mL,放在纤维素-刚果红分离培养基上,涂布。将培养皿倒置于30℃的恒温箱中培养,72 h后取出,从培养皿底部观察有水解圈的菌落,按大小形态做好标记,并编号1~N。观察并测量水解圈直径(D)和菌落直径(d),根据Hc值(Hc=D/d),确定菌株的纤维素降解能力,Hc值越大,表明降解能力越强。筛选比值最大的菌株,进行后续测定。

1.2.2 菌株的鉴定 对筛选出的XJ-132菌株委托生工(上海)生物工程有限公司利用Sanger方法进行16S rDNA测序,采用通用引物(5'-AAGTC-

GAACGATGAAACCA-3')扩增菌株的16S rDNA基因片段,采用NCBI Blast分析工具对测序结果进行比对,从而鉴定该菌株。

1.2.3 菌株分泌物的测定 利用筛选出的XJ-132菌株接种于M2培养基,调节pH至8.0。将接种后的培养基放置于恒温振荡培养箱中,设置温度为30℃,频率为180 r·min⁻¹,培养48 h。吸取菌悬液后在5000 r·min⁻¹条件下离心15 min,去除菌体。重复离心操作至彻底清除菌株残体后,将上清液与无水乙醇按体积比1:3混合,静置2 h后去除上清液,通过离心收集底部的沉淀物,所得物质即为EPS粗提取物。用超纯水将上述粗提取物溶解,再转移至0.22 pm透析袋中进行透析,每隔12 h换一次水,3 d后收集透析液体,得到纯化样品保存于-80℃冰箱中,以待后续分析测定。参考Retamal-morales等^[22]的方法测定菌株分泌物中铁载体,参考宋小双等^[23]的方法测定解磷能力,参考Shikha等^[24]的方法测定产ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)脱氨酶活性,参考刘丹^[25]的方法测定产氨(NH₃)能力,参考师璐等^[26]的方法测定产氰化氢(HCN)能力。

1.2.4 菌株对水稻稻秆降解率的测定 称取2 g水稻稻秆于培养皿中,接种经筛选得到的具有纤维素降解能力的菌株,以不接种菌株为空白对照,设3次重复。将培养皿置于30℃恒温培养箱中进行培养,分别在培养0、5、15、25和35 d取样,将不同处理的稻秆残渣用无菌水反复清洗3次,65℃下烘干至恒质量后称质量,计算稻秆相对降解率。稻秆相对降解率%=(对照组稻秆质量—降解后稻秆质量)/对照组稻秆质量×100^[27]。

1.2.5 菌株半纤维素与纤维素酶活性测定 制备浓度为1×10⁷ CFU·mL⁻¹的菌悬液,按9%的接种量分别将菌悬液接入产酶培养基中,在28℃、180 r·min⁻¹下培养8 d,每隔24 h取2 mL待测液,超声破碎15 s,间隔10 s,30次重复,然后4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液采用酶活性测定试剂盒测定半纤维素酶与纤维素酶(外切-β-1,4-葡聚糖酶、内切-β-1,4-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶)活性^[28]。

1.2.6 菌株与枯萎病病原菌的拮抗作用 采用改良对峙培养法筛选对黄瓜枯萎病、香蕉枯萎病、西瓜枯萎病、生姜枯萎病病原菌等有抑制作用的菌株。枯萎病病菌在PDA培养皿上培养7 d(28℃),用直径为5 mm的打孔器在培养皿上打取圆形琼脂块。将直径为5 mm的以上4种枯萎病菌菌饼接入PDA培养皿中央,28℃培养2 d,然后用接种环在病

原菌菌饼周围等距离2 cm处点接待测的稻秆降解菌,培养5 d(28℃),记录抑菌圈直径,每处理重复3次。记录抑制效果明显的菌株,测定其抑菌半径,并计算抑菌率。抑菌率%=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径)×100。

1.2.7 菌株对黄瓜种子萌发的影响 采用30% H₂O₂进行种子灭菌,玻璃棒搅拌30 min后用清水冲洗5~8次,彻底清洗干净后用吸水纸吸干水分,每个平板放入100粒灭菌的种子,以喷施清水为对照(CK),分别喷洒不同浓度菌液(10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰、10¹¹ CFU·mL⁻¹)后放入28℃的光照培养箱中培养,隔12 h后记录出芽情况。

1.3 数据分析

采用Excel 2007对原始数据进行整理,采用SAS对试验结果进行方差分析,并用Duncan's新复极差法进行差异显著性检验(*P*<0.05)。

2 结果与分析

2.1 稻秆降解菌的分离纯化与初筛

稻秆降解菌的筛选结果如表1所示,经分离纯化共获得160株菌株,命名XJ-1~XJ-160。经过初筛,得到1株菌株XJ-132。利用十字交叉法测量菌株XJ-132菌落直径为6.31 mm,水解圈直径为31.30 mm,Hc值为4.96,表明其具有良好的纤维素降解能力。

2.2 XJ-132菌株的鉴定

采用细菌16S rRNA通用引物对XJ-132菌株的基因组进行PCR扩增,利用NCBI数据库中的Blast程序比对分析,测序结果如图1,系统发育树如图2所示,结果表明,菌株XJ-132与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同源性达到99.93%,鉴定稻秆降解菌XJ-132为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 XJ-132分泌物质的检测

菌株XJ-132胞外分泌物组成如表2所示。与CK相比,菌株XJ-132可以分泌多种物质,产铁载体、吲哚乙酸(IAA)、产氨和产HCN能力效果显著。但菌株XJ-132产ACC解氨酶和解磷能力不明显,与CK结果一致,表明菌株XJ-132不具备产ACC解氨酶和解磷能力。

2.4 XJ-132菌株对水稻稻秆的降解作用

由图3可以看出,接种XJ-132菌株对水稻稻秆干物质降解有一定的影响。随着培养时间的延长,稻秆干物质降解率显著增高。发酵5 d后稻秆降解速率加快,水稻稻秆质量显著下降。发酵35 d时稻

表1 160株秸秆降解菌的降解能力
Table 1 Degradation ability of 160 straw-degrading bacteria

编号	菌落直径 Number diameter/mm	水解圈直径 Hydrolysis circle diameter/ mm	降解能力 Degradation ability	编号 Number	菌落直径 Colony diameter/mm	水解圈直径 Hydrolysis circle diameter/mm	降解能力 Degradation ability	编号 Number	菌落直径 Colony diameter/mm	水解圈直径 Hydrolysis circle diameter/mm	降解能力 Degradation ability	编号 Number	菌落直径 Colony diameter/mm	水解圈直径 Hydrolysis circle diameter/mm	降解能力 Degradation ability
XJ-1	2.88	12.00 c	-	XJ-41	5.84	28.50 a	+++	XJ-81	2.43	10.30 c	-	XJ-121	4.60	21.50 b	++
XJ-2	4.52	20.00 b	+	XJ-42	5.40	25.00 ab	++	XJ-82	5.28	24.50 b	++	XJ-122	4.76	22.00 b	++
XJ-3	3.56	16.00 bc	+	XJ-43	5.23	24.30 b	++	XJ-83	3.26	13.50 c	-	XJ-123	4.31	19.30 b	+
XJ-4	4.03	18.00 bc	+	XJ-44	5.14	23.70 b	++	XJ-84	3.35	14.00 c	-	XJ-124	5.23	24.30 b	++
XJ-5	2.40	10.00 c	-	XJ-45	5.08	23.30 b	++	XJ-85	3.82	17.00 bc	+	XJ-125	2.38	10.10 c	-
XJ-6	3.38	14.00 c	-	XJ-46	4.42	19.70 b	+	XJ-86	2.22	9.30 cd	-	XJ-126	4.59	21.50 b	++
XJ-7	3.39	14.00 c	-	XJ-47	4.14	18.30 bc	+	XJ-87	2.23	9.30 cd	-	XJ-127	4.36	20.30 b	++
XJ-8	3.16	13.00 c	-	XJ-48	4.53	21.00 b	++	XJ-88	4.78	22.30 b	++	XJ-128	4.96	23.00 b	++
XJ-9	2.39	10.00 c	-	XJ-49	4.54	20.00 b	+	XJ-89	4.76	22.00 b	++	XJ-129	3.74	16.50 bc	+
XJ-10	3.13	13.00 c	-	XJ-50	6.33	31.00 a	++++	XJ-90	4.38	20.50 b	++	XJ-130	4.03	18.00 bc	+
XJ-11	2.66	11.00 c	-	XJ-51	5.15	24.00 b	++	XJ-91	3.52	14.80 c	-	XJ-131	4.90	22.80 b	++
XJ-12	2.64	11.00 c	-	XJ-52	5.20	25.30 ab	++	XJ-92	6.22	29.80 a	++	XJ-132	6.31	31.30 a	++++
XJ-13	3.14	13.00 c	-	XJ-53	3.93	17.30 bc	+	XJ-93	3.48	15.50 bc	+	XJ-133	3.79	17.00 bc	+
XJ-14	5.33	25.00 ab	++	XJ-54	3.42	14.30 c	-	XJ-94	4.02	17.80 bc	+	XJ-134	4.48	19.80 b	+
XJ-15	2.99	12.30 c	-	XJ-55	5.42	26.30 ab	++	XJ-95	4.45	20.50 b	++	XJ-135	4.46	20.00 b	+
XJ-16	3.13	13.00 c	-	XJ-56	4.60	21.30 b	++	XJ-96	4.31	19.30 b	+	XJ-136	5.03	23.50 b	++
XJ-17	3.74	16.80 bc	+	XJ-57	3.22	13.30 c	-	XJ-97	3.20	13.30 c	-	XJ-137	4.31	19.00 bc	+
XJ-18	5.54	27.00 a	+++	XJ-58	4.40	20.30 b	++	XJ-98	2.22	9.30 cd	-	XJ-138	4.40	19.50 b	+
XJ-19	4.43	20.00 b	+	XJ-59	5.38	25.00 ab	++	XJ-99	6.08	29.30 a	++	XJ-139	2.43	10.00 c	-
XJ-20	4.95	23.00 b	++	XJ-60	3.64	15.00 bc	-	XJ-100	4.64	21.30 b	++	XJ-140	2.36	9.80 cd	-
XJ-21	3.96	17.70 bc	+	XJ-61	8.67	26.00 ab	++	XJ-101	6.04	29.30 a	++	XJ-141	1.78	7.50 d	-
XJ-22	4.54	21.00 b	++	XJ-62	4.52	20.70 b	++	XJ-102	3.94	17.50 bc	+	XJ-142	3.39	14.00 c	-
XJ-23	5.14	24.00 b	++	XJ-63	2.41	10.00 c	-	XJ-103	2.13	8.80 cd	-	XJ-143	5.29	24.80 ab	++
XJ-24	4.26	19.00 bc	+	XJ-64	4.51	20.00 b	+	XJ-104	5.30	25.50 ab	++	XJ-144	4.29	19.30 b	+
XJ-25	3.85	17.00 bc	+	XJ-65	6.03	29.30 a	++	XJ-105	4.32	19.50 b	+	XJ-145	3.68	16.50 bc	+
XJ-26	4.97	23.00 b	++	XJ-66	5.59	27.00 a	++	XJ-106	4.48	19.80 b	+	XJ-146	3.91	17.30 bc	+
XJ-27	4.80	22.50 b	++	XJ-67	4.61	21.30 b	++	XJ-107	4.47	20.00 b	++	XJ-147	5.20	25.30 ab	++
XJ-28	2.52	10.50 c	-	XJ-68	4.50	21.00 b	++	XJ-108	4.97	23.00 b	++	XJ-148	3.65	16.30 bc	+
XJ-29	4.42	20.00 b	+	XJ-69	3.72	16.50 bc	+	XJ-109	3.91	17.30 bc	+	XJ-149	3.66	16.50 bc	+
XJ-30	4.91	23.00 b	++	XJ-70	3.45	15.30 bc	+	XJ-110	3.54	14.80 c	-	XJ-150	4.16	18.50 bc	+
XJ-31	4.20	18.50 bc	+	XJ-71	4.65	21.30 b	++	XJ-111	3.38	14.00 c	-	XJ-151	4.13	18.30 bc	+
XJ-32	3.47	15.50 bc	+	XJ-72	3.80	17.00 bc	+	XJ-112	4.91	23.00 b	++	XJ-152	3.45	14.30 c	-
XJ-33	3.57	15.00 bc	-	XJ-73	4.45	20.50 b	++	XJ-113	4.55	21.00 b	++	XJ-153	2.99	12.30 c	-
XJ-34	3.53	14.50 c	-	XJ-74	1.97	8.30 cd	-	XJ-114	4.02	17.80 bc	+	XJ-154	3.11	13.00 c	-
XJ-35	3.27	13.50 c	-	XJ-75	2.03	8.50 cd	-	XJ-115	3.13	13.00 c	-	XJ-155	4.48	20.00 b	+
XJ-36	3.51	15.50 bc	+	XJ-76	5.35	25.70 ab	++	XJ-116	3.67	16.30 bc	+	XJ-156	4.49	21.00 b	++
XJ-37	4.46	19.80 b	+	XJ-77	5.33	25.80 ab	++	XJ-117	4.39	20.50 b	++	XJ-157	3.44	15.30 bc	+
XJ-38	2.82	11.70 c	-	XJ-78	3.77	16.70 bc	+	XJ-118	4.43	20.80 b	++	XJ-158	2.78	11.50 c	-
XJ-39	3.23	13.50 c	-	XJ-79	4.66	21.70 b	++	XJ-119	4.55	21.30 b	++	XJ-159	4.15	18.30 bc	+
XJ-40	6.18	29.80 a	+++	XJ-80	4.84	22.30 b	++	XJ-120	4.52	21.00 b	++	XJ-160	4.14	18.50 bc	+

注:-表示降解能力较差;+表示降解能力一般;++表示降解能力较好;+++表示降解能力很好。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: - indicates poor degradation ability; + indicates average degradation ability; ++ indicates good degradation ability; +++ indicates best degradation ability. Different small letters indicate significant differences ($P<0.05$).

TGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT
CAAGGCAGCATCCGTAAGTGGCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGTAACCTGTGCCAGCAGCCGGTAATACAGAGGGTGAAAGCGTTA
TGAAATGCGTAGATATAAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTG
GGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCC
CCCTGTCTTAGTACAGCACGTTATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCC GGCTTC

图1 样品拼接后序列碱基组成示例(展示部分)

Fig. 1 Example of sequence base composition after sample splicing(display section)

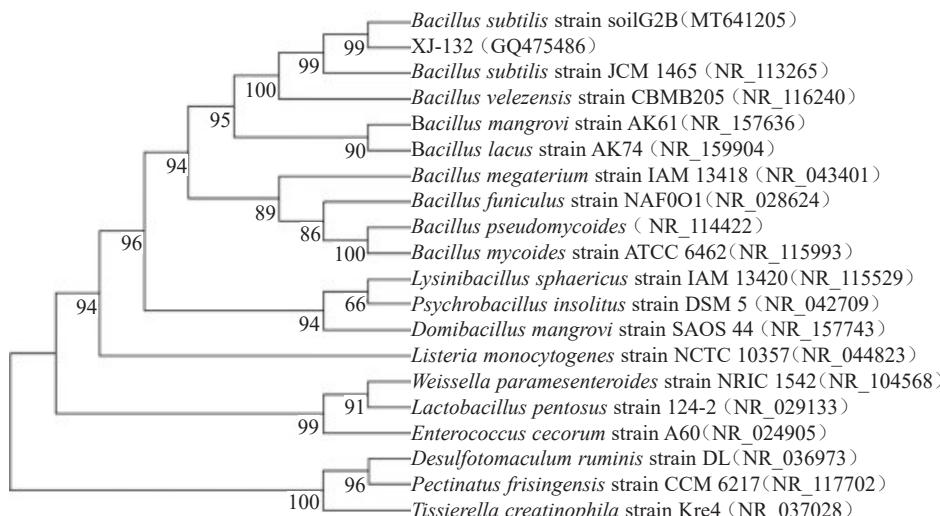


图2 依据16S rDNA序列构建的供试菌株XJ-132及相关菌株的系统发育树

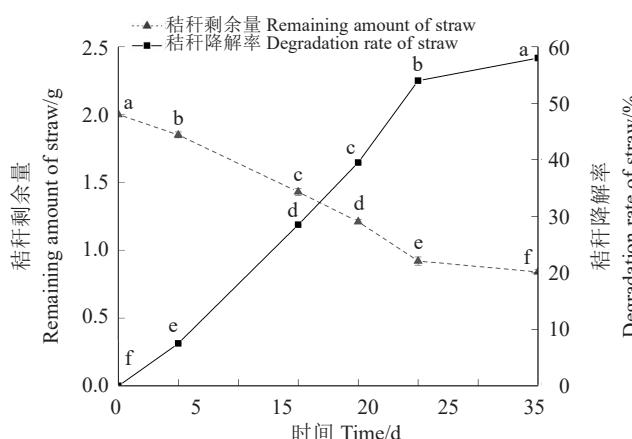
Fig. 2 Phylogenetic tree of test strain XJ-132 and related strains constructed based on 16S rDNA sequence

表2 XJ-132 分泌物质检测结果

Table 2 Detection results of XJ-132 secretory substances

处理	产铁载体	产吲哚乙酸	产 ACC 解氨酶	产氨能力	解磷能力	产 HCN 能力
Treatment	Iron carrier production	Indoleacetic acid production	Production of ACC ammonia lyase	Ammonia production capacity	Phosphorus solubilization ability	Ability to produce HCN
CK	青蓝色 Cyan	浅黄色 Light yellow	无混浊 Without turbidity	无色 Colorless	无透明圈 Non-transparent circle	黄色 Yellow
XJ-132	黄色 Yellow	粉红色 Pink	无混浊 Without turbidity	棕褐色 Brown	无透明圈 Non-transparent circle	褐色 Brown
	+	+	-	+	-	+

注:+表示产生此物质;-表示不产生此物质。 Note: + indicates the production of this substance; - indicates that this substance is not produced.



注:同一指标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different small letters of the same index indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

图3 菌株XJ-132对水稻秸秆的降解效果

Fig. 3 Degradation effect of strain XJ-132 on rice straw

秆剩余量为0.84 g, 稻秆降解率达58.00%, 说明XJ-132具有促进水稻秸秆降解的作用。

2.5 XJ-132菌株半纤维素酶与纤维素酶活性的变化

XJ-132菌株经发酵在培养时间内半纤维素酶与纤维素酶活性的变化规律如图4所示。随着培养

时间的延长, 半纤维素酶与纤维素酶活性均呈先升高后降低的趋势。其中, 半纤维素酶活性在培养第5天时达到最大值 $32.53 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后开始降低并趋于稳定。纤维素酶中外切- β -1,4-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶活性均在培养第4天时达到最大值, 分别为 $493.55 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4.90 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 内切- β -1,4-葡聚糖

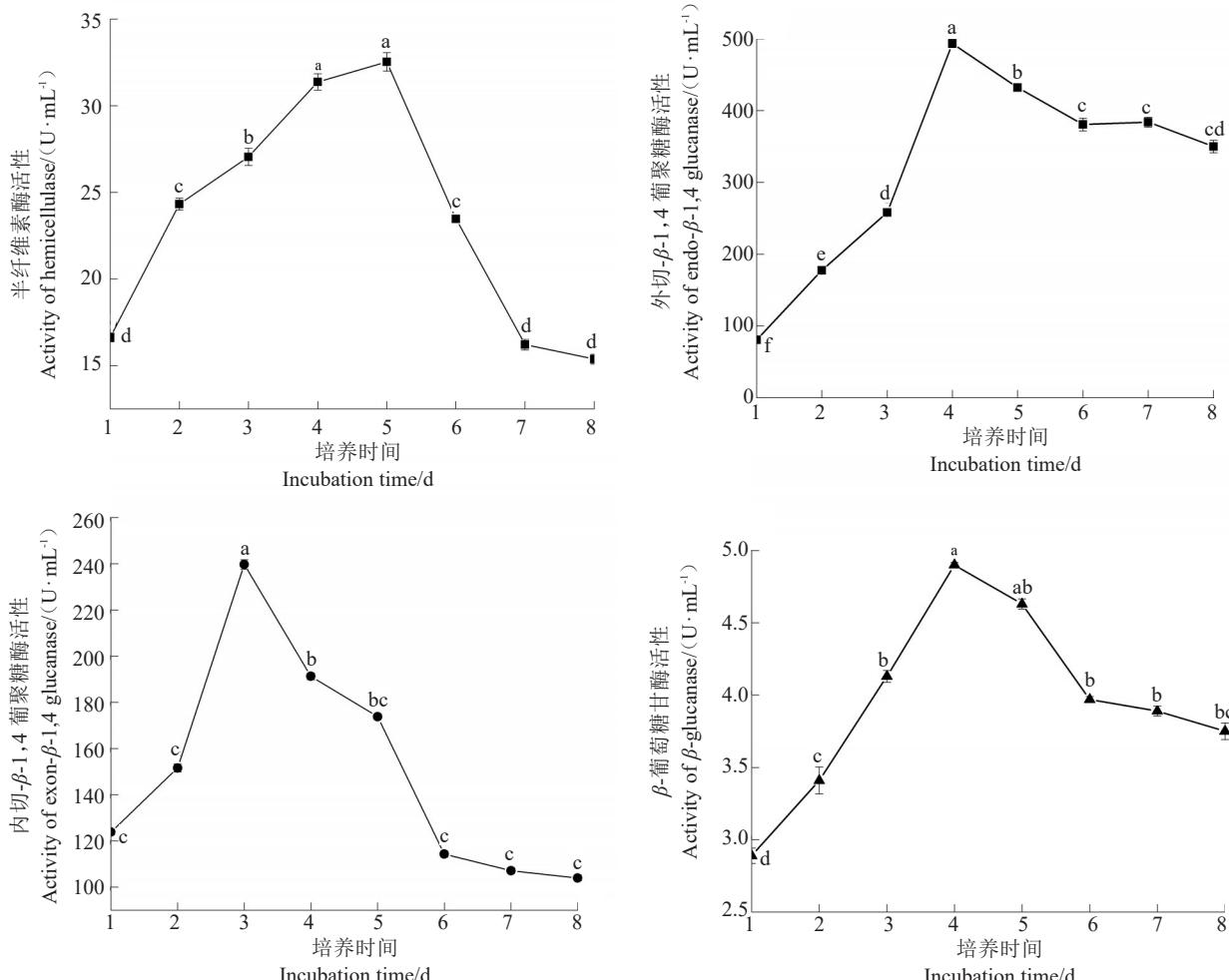


图4 菌株XJ-132的半纤维素酶与纤维素酶活性变化

Fig. 4 Changes in hemicellulose activity and cellulase activity of strain XJ-132

酶活性在培养第3天时达到最大值 $329.68 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 XJ-132菌株的抑菌效果

菌株XJ-132对不同病原菌的抑菌效果如图5、表3所示,XJ-132菌株对黄瓜、西瓜、生姜和香蕉4种尖孢镰刀菌的平板抑制效果表现出显著的一致性, 抑制率均在25%以上, 其中XJ-132对香蕉枯萎病病原菌的抑制效果最好, 菌圈抑制率达49.30%。

2.7 不同浓度XJ-132对种子萌发的影响

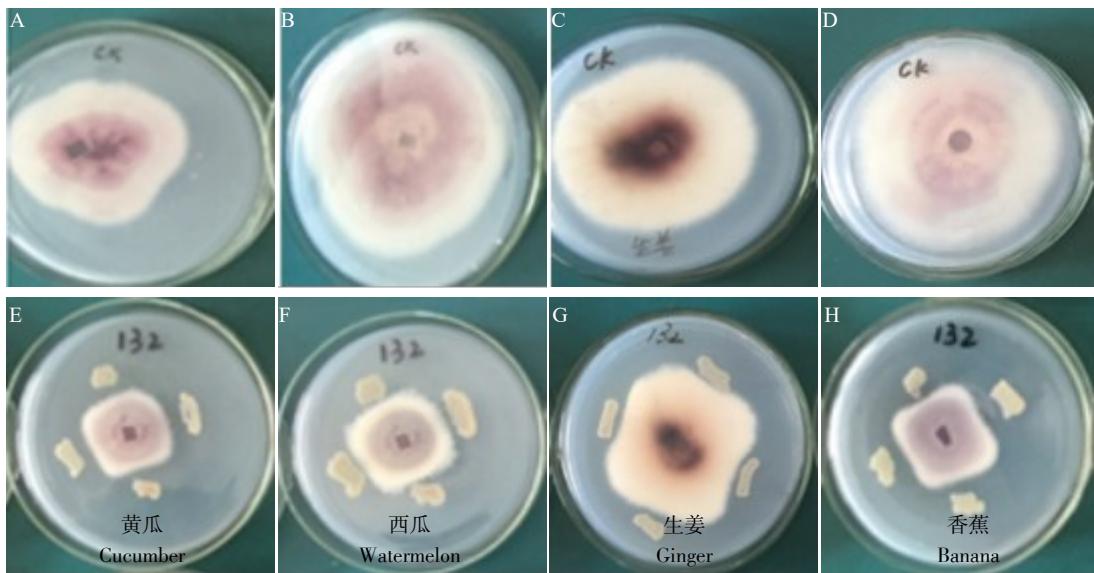
不同浓度XJ-132菌液对黄瓜种子萌发的影响如表4所示, 在浓度梯度($10^5 \sim 10^{11}$) $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 种子萌发率随菌液浓度升高整体上呈现先促后抑

的效果, 并在菌液浓度为 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时达到最大值, 与CK相比, 萌发率显著提高了4.66百分点。以上结果表明, 菌株XJ-132在一定浓度范围内对种子萌发具有显著的促进作用。

3 讨论与结论

3.1 菌株XJ-132对秸秆降解的影响

秸秆的自然降解主要靠土壤真菌、细菌和放线菌产生的胞外纤维素酶, 而高效秸秆降解菌的筛选是提高降解效率、促进秸秆资源化利用的关键^[29]。笔者从多年稻-麦轮作土壤中分离秸秆降解菌, 利用



注:A~D 分别代表黄瓜、西瓜、生姜和香蕉未接种 XJ-132 的对照;E~H 分别代表黄瓜、西瓜、生姜和香蕉接种 XJ-132。

Note: A~D represents unvaccinated XJ-132 control of cucumber, watermelon, ginger and banana, respectively; E~H represents vaccinated XJ-132 treatment of cucumber, watermelon, ginger and banana, respectively.

图 5 XJ-132 对枯萎病病原菌的平板抑制效果

Fig. 5 Antagonistic effect of XJ-132 to *Fusarium* pathogen

表 3 XJ-132 菌株对不同植物病原菌的拮抗作用

Table 3 Antagonism of XJ-132 strain against different plant pathogens

枯萎病类型 Type of <i>Fusarium oxysporum</i>	对照直径 Comparison diameter/mm	XJ-132 直径 XJ-132 diameter/mm	菌圈抑制率 Microbial inhibition rate/%
黄瓜枯萎病 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	5.40	3.30	38.90
西瓜枯萎病 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	7.10	4.80	32.40
生姜枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> Snyder et Hasen	6.70	4.90	26.90
香蕉枯萎病 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> Snyder et Hasen	7.10	3.60	49.30

表 4 不同浓度 XJ-132 对黄瓜种子发芽率的影响

Table 4 Effects of XJ-132 with different concentrations on germination rate of cucumber seeds

指标 Index	CK	菌液浓度 Concentration of bacterial solution/(CFU·mL ⁻¹)						
		10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	10 ¹¹
发芽率 Germination rate/%	92.67 bc	94.52 b	96.00 ab	96.67 a	97.33 a	92.00 c	91.37 c	90.05 cd

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters indicate significant difference($P<0.05$)。

刚果红染色法初筛-复筛,根据水解圈直径,获得菌株 XJ-132,具有纤维素降解能力。通过生物学分析,鉴定菌株 XJ-132 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),这与龚昆^[30]关于芽孢杆菌对秸秆有一定降解效果的研究结果一致。进一步研究菌株 XJ-132 对秸秆的液态发酵试验,发现培养 5 d 后,秸秆降解速率明显加快,这可能与培养 3~5 d 时纤维素酶与半纤维素酶活性均达到最大有关。培养 25 d 后,秸秆降解速率呈下降趋势,这可能是因为前期营养物质

被消耗,代谢产物不断积累,从而使酶活性下降,产物受到抑制^[16]。试验发现培养 35 d 时,水稻秸秆降解率为 58%,这与常规降解秸秆需要 2~4 个月时间相比,菌株 XJ-132 在秸秆高效腐熟方面具有良好的应用前景。

3.2 菌株 XJ-132 的半纤维素酶与纤维素酶活性

研究表明,秸秆还田后土壤微生物分泌酶类活性物质的能力明显加强,促进土壤养分转化以维持有效养分恒定^[31]。而降解秸秆中的纤维素主要是半

纤维素酶和纤维素酶共同作用的结果,这样通过酶的作用对土壤肥力产生影响,又能提高分泌秸秆降解酶类微生物的相对丰度。在本研究中,菌株XJ-132的半纤维素酶、外切- β -1,4-葡聚糖酶、内切- β -1,4-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶活性最大值分别为32.53、493.55、329.68和4.90 U·mL⁻¹。其中,内切- β -1,4-葡聚糖酶和外切- β -1,4-葡聚糖酶活性均高于刘晓飞等^[12]、张爽^[32]和魏如腾^[33]筛选菌株的酶活性,而 β -葡萄糖苷酶活性均低于以上研究。这可能是因为本试验以水稻秸秆为唯一碳源进行复筛,淘汰降解能力低的菌株,得到降解效果稳定且具有较高秸秆降解能力的菌株,但因为 β -葡萄糖苷酶的最适pH偏酸性,而本试验中菌株XJ-132的最适pH偏中性。

3.3 菌株XJ-132对土壤病原菌抑制作用的影响

微生物是土壤生态系统中的重要组成部分,土壤微生物之间相互影响,通过分泌的酶或其他信号分子,可以促进或抑制周围其他微生物的生长,进而影响作物长势^[34]。因此,接种秸秆降解菌在土壤中快速定殖,可以通过与土著菌之间的相互作用关系,达到抑制土壤病原菌的目的。本研究结果表明,菌株XJ-132对镰刀菌属(*Fusarium* sp.)等多类植物病原菌有抑制作用,这与徐彬等^[35]通过室内盆栽试验证明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种根际促生细菌,能改善土壤条件,促进植物生长,并能抑制由不同尖孢镰刀菌引起的枯萎病、根腐病等病害发生的结果一致。这可能是因为接种XJ-132菌株,改变了根际微生物的组成,从而改变根部土壤微环境,提高作物对土传病原菌的抗性。通过对菌株XJ-132的分泌物质进行测定,发现其分泌物质没有解磷能力和ACC解氨酶的生成,但是有铁载体、吲哚乙酸产生,并且具有产氨能力和产HCN的能力。这与Liu等^[36]通过对芽孢杆菌HC6代谢产物的研究,发现其对曲霉属(*Aspergillus* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.)和李斯特菌属(*Listeria* sp.)等多类植物病原菌有抑制作用的产物一致。

3.4 菌株XJ-132对种子萌发的影响

秸秆降解是极其复杂的过程,降解过程中产生的化感物质会影响种子萌发和作物的生长发育,这是多种化感物质共同作用的结果^[37]。化感物质通过抑制有效萌发所需酶的活性,进而影响种子的萌发率。研究表明,水稻秸秆浸提液可以显著抑制水稻种子发芽率及胚根与胚芽的长度^[38]。本研究结果表明,喷施不同浓度降解菌发酵液对黄瓜种子的萌发

效果不一,高浓度的降解菌发酵液有抑制种子萌发的效果,而低浓度的菌液对种子的萌发有促进作用,这与何志刚等^[39]的研究结果一致。这可能是因为接种高效秸秆降解菌剂,降低了化感物质的浓度,减弱了化感作用。

综上所述,笔者从秸秆还田土壤中筛选枯草芽孢杆菌XJ-132菌株,具有较高的半纤维素酶与纤维素酶活性,能快速降解水稻秸秆,同时对土壤病原菌具有良好的抑制效果,特别是对香蕉枯萎病菌圈抑制率达49.30%。利用菌株XJ-132发酵液喷施黄瓜种子,发现其在一定浓度范围内能够显著促进种子萌发,并在菌液浓度为10⁸ CFU·mL⁻¹时达到最大值。

笔者筛选的XJ-132菌株产半纤维素酶与纤维素酶的活性高于以往的研究,且表现出一定的促进种子萌发以及抑制土传病害的功能,但由于水稻秸秆致密的晶体结构,单一微生物对水稻秸秆的降解作用会受到极大的限制,需要多种微生物菌落的协同作用才能达到更好的效果。此外,针对单一菌株在实际生产应用中存在活性不高、环境抵抗性差和生长潜力低等问题,随着目前秸秆降解菌的筛选和培养技术工艺的完善,秸秆降解菌剂开发与下一步的推广应用有向复合菌系发展的趋势。

参考文献

- [1] 张琴,李艳宾,滕立平,等.不同腐解方式下棉秆腐解液对棉花枯、黄萎病菌的化感效应[J].农业环境科学学报,2012,31(9):1696-1701.
- [2] CHEN Z M, WANG H Y, LIU X W, et al. Changes in soil microbial community and organic carbon fractions under short-term straw return in a rice-wheat cropping system[J]. Soil and Tillage Research, 2017, 165:121-127.
- [3] WANG H X, XU J L, SHENG L X. Preparation of straw biochar and application of constructed wetland in China: A review[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 273:123131.
- [4] 修志君,宋亚迪,张冬梅,等.马铃薯秸秆降解菌的筛选鉴定及其降解能力测定[J].中国蔬菜,2022(12):45-51.
- [5] 张楠,杨兴明,徐阳春,等.高温纤维素降解菌的筛选和酶活性测定及鉴定[J].南京农业大学学报,2010,33(3):82-87.
- [6] 牛文娟.主要农作物秸秆组成成分和能源利用潜力[D].北京:中国农业大学,2015.
- [7] 文少白,李勤奋,侯宪文,等.微生物降解纤维素的研究概况[J].中国农学通报,2010,26(1):231-236.
- [8] 唐欣昀.微生物学[M].北京:中国农业出版社,2009.
- [9] 区惠平,何明菊,黄景,等.稻田免耕和稻草还田对土壤腐殖质和微生物活性的影响[J].生态学报,2010,30(24):6812-6820.
- [10] 段杰.东北地区秸秆纤维素降解菌的筛选及高效降解菌系的构建[D].长春:吉林农业大学,2015.

- [11] 陈露露.玉米秸秆降解菌的分离鉴定及其降解性能研究[D].哈尔滨:黑龙江科技大学,2019.
- [12] 刘晓飞,宋洁,马京求,等.产纤维素酶放线菌的筛选鉴定及其对玉米秸秆的降解[J].精细化工,2020,37(8):1657-1664.
- [13] 史彬,黄魏魏,付丹妮,等.秸秆降解放线菌GC的筛选及其应用基础研究[J].微生物学杂志,2018,38(2):43-49.
- [14] 冯忻,裴宇航,周晓飞,等.纤维素降解菌的筛选与高效混合菌群的构建[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(4):155-160.
- [15] RATZKE C, BARRERE J, GORE J. Strength of species interactions determines biodiversity and stability in microbial communities[J]. Nature Ecology and Evolution, 2020, 4(3):376-383.
- [16] 罗慧.秸秆降解功能菌株的筛选及互作研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2021.
- [17] 董金皋.农业植物病理学[M].3版.北京:中国农业出版社,2015.
- [18] 姜珊,李衍素,王娟娟,等.我国秸秆还田技术发展现状[J].中国蔬菜,2021,11:27-32.
- [19] 赵永强,徐振,张成玲,等.稻麦秸秆全量还田对小麦纹枯病发生的影响[J].西南农业学报,2017,30(5):1063-1067.
- [20] 柳焕章,刘建钗,周敬霄.微生物间拮抗的研究方法与农业应用[J].安徽农业科学,2011,39(3):1310-1314.
- [21] 王伟,郑大浩,杨超博,等.高效纤维素分解菌的分离及秸秆降解生物效应[J].中国农业科技导报,2019,21(8):36-46.
- [22] RETAMAL-MORALES G, MEHNERT M, SCHWABE R, et al. Detection of arsenic-binding siderophores in arsenic-tolerating actinobacteria by a modified CAS assay[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 157:176-181.
- [23] 宋小双,遇文婧,周琦,等.樟子松根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J].中国农学通报,2020,36(32):76-81.
- [24] SHIKHA G, SANGEETA P. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*phaseolus vulgaris*) plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:1506.
- [25] 刘丹.植物促生菌 *Klebsiella pneumoniae* SnebYK 诱导大豆抗逆性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [26] 师璐,李阳,李国龙,等.高产纤维素酶枯草芽孢杆菌S-16的筛选及其发酵工艺优化[J].生物资源,2017,39(2):118-124.
- [27] 姜珊珊,李光艳,吴斌,等.有机物料腐熟剂对玉米秸秆降解及小麦生长的影响[J].山东农业科学,2019,51(12):63-66.
- [28] 刘东阳,王蒙蒙,马磊,等.高效纤维素分解菌的分离筛选及其分解纤维素研究[J].南京农业大学学报,2014,37(6):49-58.
- [29] 耿丽平.秸秆还田土壤中高效纤维素分解菌的筛选、鉴定及其生物效应研究[D].河北保定:河北农业大学,2012.
- [30] 龚昆.秸秆降解菌的筛选及复合菌系的构建[D].武汉:中南民族大学,2020.
- [31] YANG H S, LI Y F, ZHAI S L, et al. Long term ditch-buried straw return affects soil fungal community structure and carbon-degrading enzymatic activities in a rice-wheat rotation system[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 155:103660.
- [32] 张爽.低温纤维素降解菌的筛选及其玉米秸秆降解效果研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [33] 魏如腾.高效降解玉米秸秆复合菌系的构建[D].太原:山西农业大学,2016.
- [34] SUN X, CAI P, SORENSEN S J, et al. Interspecific interactions in dual-species biofilms of soil bacteria: Effects of fertilization practices[J]. Journal of Soil and Sediments, 2020, 20 (3) : 1494-1501.
- [35] 徐彬,徐健,祁建杭,等.枯草芽孢杆菌1013对连作障碍土壤的改良及对番茄的促生作用[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2021,42(2):111-116.
- [36] LIU Y, TENG K, WANG T, et al. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: Production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 128(1):242-254.
- [37] 赵先龙.玉米秸秆腐解液化感效应及典型化感物质分离鉴定[D].哈尔滨:东北农业大学,2014.
- [38] 胡帅珂.水稻秸秆化感物质对水稻生长发育的影响及消除化感影响的研究[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [39] 何志刚,刘慧屿,刘艳等.基于高通量测序技术筛选低温秸秆降解菌群的研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2021,41(6):75-84.