

刘文佳, 刘天一, 张俐敏, 等. PGPR 微胶囊菌剂研发及其对玉米的促生效果评价 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (3): 266–275.

LIU W J, LIU T Y, ZHANG L M, et al. Microencapsulated Rhizosphere Bacteria for Promoting Growth of Corn Plants [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (3): 266–275.

PGPR 微胶囊菌剂研发及其对玉米的促生效果评价

刘文佳, 刘天一, 张俐敏, 徐 畅, 莫继先*

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:【目的】为了提高植物根际促生菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 对作物促生作用的稳定性, 研制出以 PGPR 复合菌液为原料的微胶囊菌剂, 探究其对玉米的促生效果。【方法】从玉米根际土壤中分离得到 2 株 PGPR 菌株并制备成复合液体菌液。分别用海藻酸钠 (SA) 和 CaCl_2 作为包埋剂和交联剂, 对复合菌液进行包埋以制备微胶囊菌剂。以复合微胶囊菌剂制备的难易程度和菌株包埋率、增殖前活菌数及增殖后活菌数为评价指标, 确定微胶囊菌剂制备的最优条件。通过分析微胶囊菌剂在不同聚乙二醇含量、温度、pH、存储时间以及盐含量下的菌株生长及其对玉米生长和根系形态的影响确定 PGPR 微胶囊菌剂的特性。【结果】分离得到了 2 株 PGPR 菌株, 具有多种植物促生功能。使用质量分数为 1%SA-3% CaCl_2 制备的微胶囊菌剂稳定性较好, 包埋率达 91.27%, 增殖后的微胶囊活菌数达到 $8.73 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 增殖 7.79 倍。微胶囊菌剂在不同干旱、温度、pH、存储时间和盐浓度条件下对 PGPR 菌株具有较好的保护作用。PGPR 微胶囊菌剂对玉米有显著的促生作用, 施用微胶囊菌剂使玉米株高、苗干重和根干重分别增加 91.83%、81.82% 和 29.57%。同时微胶囊菌剂也显著提高了玉米总根长、根表面积、根平均直径、根体积和根尖数。【结论】探明了一种 PGPR 微胶囊菌剂的制备方法, 施用该 PGPR 微胶囊剂能够显著促进玉米生长、改善玉米根系形态, 对玉米的促生效果优于液体菌剂。

关键词: 玉米; 根际促生菌; 促生效果; 微胶囊菌剂

中图分类号: S541

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 03-0266-10

Microencapsulated Rhizosphere Bacteria for Promoting Growth of Corn Plants

LIU Wenjia, LIU Tianyi, ZHANG Limin, XU Chang, MO Jixian*

(College of Life Science, Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: 【Objective】Microencapsulation was applied to improve the stability of PGPRs for promoting corn growth.

【Method】Rhizosphere bacteria that promote corn growth were isolated. The bacteria in broth were encapsulated using sodium alginate (SA) and CaCl_2 . Based on operation efficiency and PGPR survival rate, optimal conditions for the encapsulation were determined. Properties of the microencapsulated agent were analyzed for field applications with respect to the bacterial proliferation under varied artificial dehydration created by using polyethylene glycol (PEG) and salt, temperatures, pHs, and storage times as well as the growth and root morphology of the treated corn plants. 【Result】Two PGPR strains with multiple plant growth promoting functions were isolated. The microcapsule microbial agent prepared with a mass fraction of 1% SA-3% CaCl_2 had good stability. The embedding rate of the microcapsule microbial agent reached 91.27%, the number of live bacteria reached $8.73 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, and the proliferation was 7.79 times. Significant protection against the imposed adverse conditions was observed. In comparison with the virgin PGPRs broth, the encapsulation also significantly enhanced the growth of the treated corn plants with a 91.83% increase on plant height, 81.82% on seedling dry weight, and 29.57% on root dry weight over control. In addition, the total length, surface area, diameter, volume, and tip number of the roots of the corn plants grown with the encapsulated PGPRs were significantly increased as well. 【Conclusion】Microencapsulation significantly improved the stability as well as the root morphology and growth promoting effect of PGPRs on the corn plants.

Key words: Corn; rhizosphere bacteria; growth-promoting effect; microencapsulated

收稿日期: 2023-12-22 修回日期: 2024-02-07

作者简介: 刘文佳 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事资源环境微生物学研究, E-mail: 1740203063@qq.com

* 通信作者: 莫继先 (1982—), 男, 博士, 教授, 主要从事资源环境微生物学研究, E-mail: mojixian8208@sina.com

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费项目 (135409420); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (S202310232017)

0 引言

【研究意义】人们对作物高产的迫切追求导致化肥和其他农用化学品的滥用^[1],造成农田土壤酸化、盐渍和板结,以及病虫害增多和土壤退化等问题。微生物菌肥在改良土壤、抑制土传病害、增强作物抗逆性和提质增产等方面具有显著效果,同时也可以消除化肥对农田环境的破坏^[2]。随着微生物菌肥的需求逐渐增大,各种新型微生物菌剂不断涌现。传统的微生物菌剂主要有液体菌剂和颗粒菌剂。通过微胶囊包埋固定化技术制备的微胶囊菌剂在运输、储存、高活性和缓释等方面与传统菌剂相比具有显著优势,开发新型的微胶囊微生物菌剂已成为研究热点。【前人研究进展】使用植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)作为肥料是实现农业可持续集约化的一种生物学方法^[3]。许多基于 PGPR 的微生物菌剂一般直接施入土壤中,PGPR 菌株会直接暴露在土壤环境中。土壤的空间异质性会导致 PGPR 菌剂性状不稳定、存活期短、有效发挥作用的活菌数量低,制约了微生物菌剂在农业中的广泛应用^[4]。因此菌剂保护性载体的选择是 PGPR 存活和发挥作用的关键。研究发现将菌体细胞固定在合适的载体上,能够有效提高菌体的存活率和缓释性^[5]。微胶囊技术是一种能够形成膜状结构并将固体或液体芯材包裹在内的技术,使被包裹物形成微小粒子^[6],这样制得的微胶囊能够保护囊心物质不受外界环境的影响^[7]。海藻酸钠(SA)微胶囊被认为是一种优良的载体,它的生物兼容性和机械稳定性较强,且原料易获取,价格低廉。海藻酸钠微胶囊的制备工艺相对简单,易与 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子进行交联形成稳定的结构。常见的交联剂包括氯化钙、氯化钡和戊二醛。陈妮娜等^[8]以 SA 为载体,以 CaCl_2 作为交联剂制备微胶囊,结果表明 SA- CaCl_2 微胶囊具有较高的成膜型和较强的抗水性。张琳等^[9]用 SA 作为载体包埋益生菌,发现制备的 SA 微胶囊具有较强的耐高温能力,可以保护包埋的益生菌在高温下存活。目前 SA 已经成为医学、生物学、材料科学、制药制造、食品等多学科的研究热点,具有广泛的应用前景。【本研究切入点】液体菌剂由于稳定性差、难于保存和运输以及使用效果受环境影响等因素限制了其应用范围。而以 SA 为载体制备的微胶囊菌剂广泛应用于制药和食品等领域,但应用于农业生产方面较少,为此 PGPR 微胶囊菌剂的制备工艺及其植物促生作用有待进一步研究。【拟解决的关键问题】本研究拟通过适宜

的材料配比确定一种高包埋率和机械稳定性的 PGPR 微胶囊菌剂制备工艺,进而通过分析 PGPR 微胶囊菌剂的理化特性及其对玉米的促生作用,明确 PGPR 微胶囊菌剂的优良特性,皆在为制备新型 PGPR 微生物菌剂提供理论依据,进而更好地发挥微生物菌肥的使用效果和应用范围。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米根际土壤采样于黑龙江省齐齐哈尔市一处玉米田($47^{\circ}21'16''\text{N}$, $123^{\circ}55'6''\text{E}$)。采用的玉米品种为坤丰,玉米育苗基质土为市售。

盆栽容器:市面上销售的塑料盆,高 12.8 cm,上直径 14.5 cm,下直径 10.3 cm,杯底部扎有 10~14 个 5 mm 的孔洞用于渗水。NB 培养基(1 L): NaCl 5.0 g,牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g, pH 7.0。PKO 无机磷培养基(1 L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g,葡萄糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 2.0 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, KCl 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g, pH 7.0。亚历山大罗夫培养基(1 L):蔗糖 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, Na_2PO_4 2.0 g, CaCO_3 0.1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g,钾长石粉 1.0 g, pH 7.0。无氮培养基(1 L):甘露醇 10.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, NaCl 0.2 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCO_3 5.0 g, pH 7.2。固体培养基:1 L 液体培养基加琼脂 20.0 g。包埋剂:海藻酸钠(SA),分析纯试剂(AR)。交联剂: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AR。缓冲液:柠檬酸钠 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AR。造粒工具:一次性注射器,规格 10 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 PGPR 的筛选

将玉米根系上的大块根际土抖落,用无菌水将根系附着的土壤涮下并收集,离心后称取 1 g 土壤与 9 mL 无菌水混合震荡制成土壤悬浊液,再加入 10 mL 质量分数为 60% 的聚乙二醇(PEG)-6000 模拟干旱条件,在 30°C 、 $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 72 h。菌悬液梯度稀释至 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度,分别吸取 0.1 mL 涂布于 PKO 无机磷培养基平板和亚历山大罗夫培养基平板筛选解磷菌和解钾菌。 30°C 培养箱内培养 5 d。根据解磷圈和解钾圈大小,筛选优势菌株进行分离纯化并于 -20°C 保藏。采用富集纯化法^[10]分离固氮菌。取 10 mL 菌悬液加入 90 mL 液体无氮培养基中, 30°C 、 $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 5 d,取 1 mL 培养物接种至 100 mL 液体无氮培养基中再培养。每 3 d 转接 1 次,重复转接 4 次后,梯度稀释并涂布在固体无氮

培养基平板上, 筛选、纯化菌株后于-20℃保藏。

1.2.2 PGPR 植物促生特性分析

采用钼锑抗比色法^[11] (紫外可见分光光度计, 752N) 测定菌株解磷能力; 火焰原子分光光度计法^[12] (火焰分光光度计, FP6410) 测定菌株解钾能力; 采用碳氮分析仪 (总有机碳总氮分析仪, multiNC2100s) 测定菌株固氮能力; 采用 Salkowski 比色液比色法^[13] 测定菌株分泌吲哚乙酸能力; 采用 CAS 检测液检测法^[14] 测定菌株铁载体合成能力。参考韩坤等^[15] 的方法测定菌株的 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) 脱氨酶活性。

1.2.3 菌株生长曲线测定

将保藏的菌株分别接种于 50 mL NB 液体培养基 30℃、140 r·min⁻¹ 振荡培养 16 h 活化, 然后转接至 100 mL NB 液体培养基中, 同上述条件下培养 24 h, 每隔 2 h 测定菌液的吸光值 (OD₆₀₀), 绘制各菌株生长曲线。

1.2.4 菌种的理化性质分析与种属鉴定

菌株形态学鉴定与生理生化试验方法参考《常见细菌系统鉴定手册》^[16] 进行操作。16S rDNA 测序工作由上海生工生物工程公司进行, 采用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。将测序结果于 NCBI 数据库中进行同源性比对, 使用 MEGA 7.0 构建菌株系统进化树。将测得序列上传至 GenBank 获得菌株登录号。

1.2.5 微胶囊菌剂的制备

将 2 种菌株分别于 NB 液体培养基中培养 24 h, 6000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体细胞。将收集到的 2 种菌株稀释至 OD₆₀₀=0.5 后等比例混合成复合菌液, 并与质量分数分别为 2%、4% 和 6% 的包埋剂 SA 按 1:1 (V/V) 的比例混合得到 SA 质量分数为 1%、2% 和 3% 的混合物。将混合物分别滴入含有质量分数为 2%、3% 和 4% 的 CaCl₂ 溶液中, 制备微胶囊菌剂。微胶囊菌剂的制备过程如下: 用注射器分别吸取 3 种不同质量分数的 SA-复合菌液混合物, 将针头竖直对准 CaCl₂ 溶液的表面中心, 保持液面与针头的高度为 5~10 cm。慢慢推动注射器的活塞, 使混合溶液缓缓地滴入 CaCl₂ 溶液中形成液滴并在 4℃冰箱中交联 24 h, 滤除成球性不佳或粘连的颗粒获得微胶囊菌剂。将制备的微胶囊颗粒置于 NB 液体培养基中增殖培养 24 h 获得增殖后的微胶囊菌剂并保存于 4℃冰箱^[17]。

1.2.6 微胶囊菌剂指标测定

随机选取 20 个微胶囊菌剂球粒将它们排列成一

排, 用游标卡尺测量总长度, 计算每个微胶囊菌剂球粒的粒径直径 (cm)。颗粒机械强度按如下方法测定: 将 4 粒大小一致的新鲜微胶囊菌剂放在水平玻璃板上, 同时在这些微胶囊颗粒上放置一个塑料培养皿。逐渐增加培养皿中的重量, 直到颗粒开始发生变形, 测量培养皿总质量 (G)。颗粒机械强度/g=G/4。取增殖前和增殖后的颗粒菌剂各 5 粒, 放入 0.2 mol·L⁻¹ 的柠檬酸钠溶液中, 定容 10 mL, 使用漩涡混合器振荡, 直到颗粒完全破碎。使用稀释涂布平板法测定活菌数^[18], 并计算增殖前和增殖后颗粒菌剂的活菌数 (cfu·g⁻¹)、包埋率 (%) 和增殖倍数。颗粒菌剂活菌数/(cfu·g⁻¹)=平板计数菌落数/颗粒重量; 包埋率/%=颗粒菌剂中的活菌数/原复合菌液活菌数×100; 增殖倍数=增殖后颗粒菌剂中的活菌数/增殖前颗粒菌剂中的活菌数^[19]。

1.2.7 环境条件对微胶囊菌剂的影响

将复合菌液 1 mL 和含有 1 mL 菌液微胶囊菌剂颗粒分别接种于下列条件的 NB 液体培养基中, 于 37℃、140 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h 测量 OD₆₀₀ 吸光值, 以评价干旱、温度、pH 和盐对微胶囊菌剂的影响。干旱条件: 含有质量分数分别为 10%、20%、40%、60% 和 80% PEG-6000 的 NB 液体培养基; pH 条件: 调节 NB 液体培养基的 pH 分别 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0; 温度条件: 将接种后的 NB 液体培养基分别置于 10、20、30、40℃的培养箱中; 盐条件: 含有质量分数分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% NaCl 的 NB 液体培养基。将接种后的 NB 液体培养基分别储存 12、24、36、48、60、72 h 测量 OD₆₀₀ 评估菌剂的存储稳定性。

1.2.8 微胶囊菌剂对玉米促生效果评价

选取颗粒饱满且大小一致的玉米种子置于 150 mL 锥形瓶中, 用无菌水冲洗 3 次。使用 75% 酒精和 3% 的次氯酸钠分别浸泡 5 min 对玉米种子消毒。冲洗后将种子放入滤纸盘中并加入 10 mL 无菌水, 避光培养使玉米种子发芽。选取芽体长度一致的玉米种子移栽至盆栽土壤中, 分别施加 20 mL 的无菌液空胶囊 (CKO)、液态微生物菌剂 (JY) 和微胶囊微生物菌剂 (JN) (颗粒菌剂需破碎后计算 20 mL 等量的颗粒数), 同时设置施加无菌水作为空白对照组 (CK)。室温 25℃培养玉米生长 15 d 测定各项指标。使用刻度尺测量玉米的自然高度作为株高; 测定玉米植株和根部烘干后的重量作为苗干重和根干重; 使用根系扫描仪 (托普云农 GXY-A) 测量玉米的根长、根表面积、根平均直径、根尖数和根体积。

1.3 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2019 软件对数据整理与统计，用 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA）。数据作图与分析采用 Origin 软件。使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建菌株系统发育树。图表中数据以 mean±SD 形式表示（n=3）。

2 结果与分析

2.1 PGPR 植物促生特性分析

从玉米根际土壤中初步筛选出 50 株根际促生菌，其中 6 株具有溶解无机磷能力，5 株具有解钾能

力，3 株具有固氮能力，测定结果见表 1。其中解磷量最高的菌株为 P1，7 d 发酵液中有效磷含量为 33.50 μg·mL⁻¹。解钾量最高的菌株为 K5，7 d 发酵液中 K⁺含量为 2.26 μg·mL⁻¹。固氮量最高的菌株为 N1，7 d 发酵液中 N 元素含量为 1.96 μg·mL⁻¹。同时 P1 也有固氮能力且 N 元素含量为 1.44 μg·mL⁻¹。此外，5 株菌株具有产吡啶乙酸的能力，产量最高的菌株为 P1，2 d 发酵液中吡啶乙酸质量浓度达到 78.06 μg·mL⁻¹；10 株菌株具有合成铁载体的能力，产量最高的菌株为 P1，2 d 发酵液中铁载体活性为 55.72%；ACC 含量最高的菌株为 K5，质量浓度达到 0.34 μg·mL⁻¹。

表 1 玉米根际土壤中筛选的具有促生特性的菌株及促生特性分析
Table 1 Strains and properties of corn growth-promoting bacteria from rhizosphere soil

菌株 Strains	解磷量 Phosphate solubilizing/ (μg·mL ⁻¹)	解钾量 Potassium releasing/ (μg·mL ⁻¹)	固氮量 Nitrogen fixation/ (μg·mL ⁻¹)	吡啶乙酸 Indoleacetic acid/ (μg·mL ⁻¹)	铁载体活性 Siderophore activity/%	ACC 含量 ACC content/ (μg·mL ⁻¹)
P1	33.50±0.37a	—	1.44±0.16b	78.06±0.51a	55.72±0.67a	0.19±0.07e
P2	31.49±0.51b	—	—	65.74±1.61b	44.19±0.94d	0.30±0.07b
P3	31.34±0.58b	—	—	—	49.12±0.35b	0.27±0.05c
P4	30.85±0.59b	—	—	—	46.47±0.27c	0.22±0.14d
P5	30.12±0.03c	—	—	46.23±3.25d	40.48±0.44e	0.14±0.07f
P6	31.13±0.04b	—	—	—	39.65±0.38e	0.20±0.06e
N1	—	—	1.96±0.35a	—	33.5±0.527f	0.27±0.11c
N2	—	—	1.27±0.21b	—	—	0.14±0.02f
N3	—	—	1.23±0.10b	—	—	0.22±0.03d
K1	—	1.22±0.09b	—	55.63±0.54c	31.52±0.39g	0.14±0.02f
K2	—	1.17±0.07b	—	—	—	0.30±0.06b
K3	—	1.26±0.07b	—	—	29.34±0.35g	0.25±0.13cd
K4	—	1.35±0.28b	—	—	—	0.18±0.07e
K5	—	2.26±0.07a	—	63.43±2.9b	50.46±0.71b	0.34±0.05a

同列数据后不同字母表示差异显著（P<0.05）；—表示无此项促生功能。
Data with different letters on same column indicate significant differences (P<0.05); —indicate no growth-promoting function.

2.2 目标菌株的确定

从各菌株促生特性以及功能多样性的角度综合分析，菌株 P1 具有最强的解磷和产吡啶乙酸能力且同时具有合成铁载体和产 ACC 的性质。菌株 K5 具有最强的解钾能力和产 ACC 能力且同时具有合成铁载体和产吡啶乙酸的性质。因此本研究选取 P1 和 K5 作为目标菌株。拮抗试验表明 2 株菌株间相互无影响（图 1）。

2.3 菌种的理化性质分析及种属鉴定

菌株 P1 为乳白色圆形不透明菌落且具有黏性，表面光滑湿润，边缘整齐（图 2-a）。菌株 K5 为白色

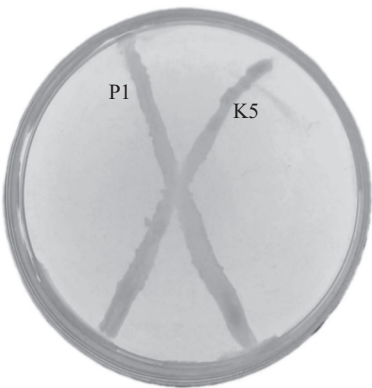


图 1 菌株 P1 和 K5 的菌间拮抗试验
Fig. 1 Interbacterial antagonism between P1 and K5

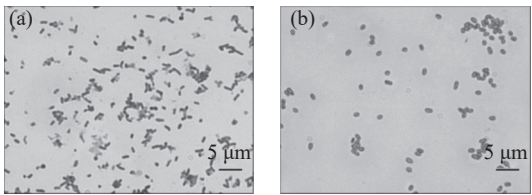


图 2 菌株 P1 (a) 和 K5 (b) 的显微形态
Fig. 2 Microscopic morphology of P1 (a) and K5 (b)

圆形不透明菌落，表面光滑干燥，边缘整齐（图 2-b）。菌株 P1 和 K5 的生理生化试验分析结果如表 2 所示。对 2 株菌株的基因序列比对和构建系统进化树（图 3、4），结果表明，菌株 P1 和 K5 分别与

Pseudomonas silesiensis strain PDEC9（MZ496605.1）和 *Bacillus sp.* strain IRNBI-25（OP364514.1）处于同一分支，序列相似性分别为 99.63% 和 99.30%。因此，菌株 P1 和 K5 分别属于假单胞菌属和芽孢杆菌属，命名为 *Pseudomonas silesiensis* P1 和 *Bacillus sp.* K5。2 株菌株的序列上传 GenBank 获得的登录号分别为 OR889160和 OR890438。菌株 P1 和 K5 发育迟缓期极短，菌株进入对数生长期后，迅速生长繁殖，18 h 进入生长平稳期（图 5）。

2.4 微胶囊菌剂制备的操作性和成球性
不同质量分数的 SA 和 CaCl₂ 配比中操作性和成

表 2 菌株 P1 和 K5 的生理生化特性
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of P1 and K5

菌株 Strains	淀粉水解 实验 Starch hydrolysis	蔗糖发酵 实验 Sucrose fermentation	乳糖发酵 实验 Lactose fermentation	葡萄糖发酵 实验 Glucose fermentation	甲基红实验 Methyl red experiment	柠檬酸盐 实验 Citrate experiment	吲哚实验 Indole experiment	革兰氏染色 实验 Gram staining experiment	触酶实验 Catalase experiment	伏-普实验 Volt-P experiment
菌株 Strains	P1	—	+	—	+	—	—	+	+	+
	K5	—	—	+	—	—	—	+	+	—

+: 阳性; —: 阴性;
+: positive; -: negative.

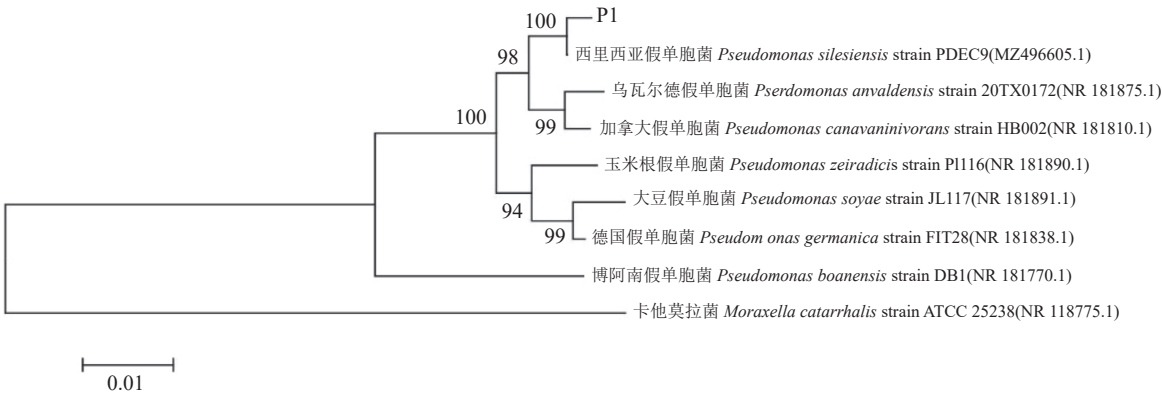


图 3 菌株 P1 的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of P1

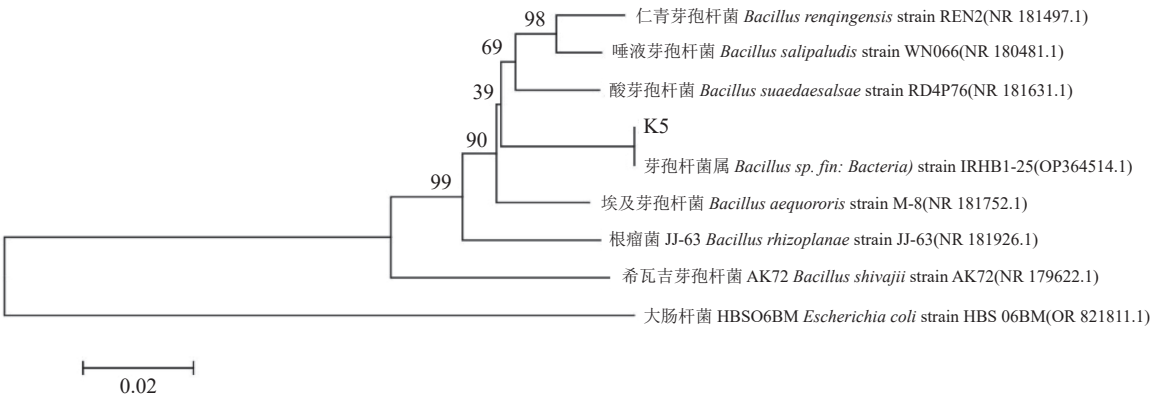


图 4 菌株 K5 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of K5

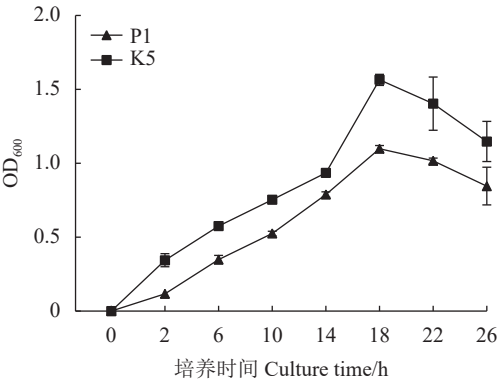


图 5 菌株 P1 和 K5 的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of P1 and K5

球性较好的是 SA 1%-CaCl₂ 2%、SA 1%-CaCl₂ 3% 和 SA 2%-CaCl₂ 2%，表现为易操作且成球形较好、少量粘连或无粘连。SA 浓度较低时，埋包颗粒交联程度过强容易发生拖尾现象；SA 和 CaCl₂ 浓度同时过高时成球性较差且有部分颗粒破碎（表 3）。

表 3 不同质量分数 SA-CaCl₂ 配比下微胶囊的操作性和成球性

Table 3 Microencapsulation of PGPRs with varied SA-CaCl₂ combinations

配比组合 Varied combination	操作性 Operation	成球性 Sphericity
1%SA	2%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，无粘连 Better, trailing, no sticking
	3%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，少量粘连 Better, trailing, few sticks
	4%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，少量粘连 Better, trailing, few sticks
2%SA	2%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，无粘连 Better, trailing, no sticking
	3%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，少量粘连 Better, trailing, few sticks
	4%CaCl ₂ 易 Easy	较好，拖尾，少量粘连 Better, trailing, few sticks
3%SA	2%CaCl ₂ 难 Difficult	较差，无拖尾，少量破碎 Bad, no trailing, few fragile
	3%CaCl ₂ 难 Difficult	较差，拖尾，少量粘连 Bad, trailing, few sticks
	4%CaCl ₂ 难 Difficult	差，拖尾，少量破碎，易粘连 Poor, trailing, few fragile, sticks

2.5 微胶囊菌剂的理化性质

采用不同质量分数的 SA 和 CaCl₂ 组合制备的微胶囊菌剂包埋率均达 80% 以上，最高增殖倍数组合为 SA1%-CaCl₂3%，此浓度组合的微胶囊菌剂平均粒径为 3.11 mm（图 6），平均机械强度为 3.21 g，平均包埋率达 91.27%，增殖后微胶囊菌剂微生物数量

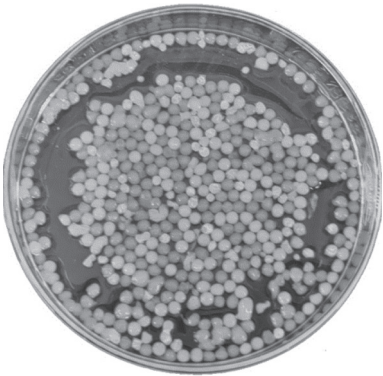


图 6 SA1%-CaCl₂3% 微胶囊颗粒形态

Fig. 6 Morphology of 1% SA-3% CaCl₂ microcapsules

为增殖前的 7.79 倍，优于其他 SA 和 CaCl₂ 浓度的组合（表 4）。

2.6 环境条件对微胶囊菌剂的影响

随着 PEG-6000 浓度的升高，液体菌剂和微胶囊菌剂的 OD₆₀₀ 值均显著下降，但各 PEG 浓度下微胶囊菌剂的 OD₆₀₀ 均高于液体菌剂，表明干旱胁迫条件下，微胶囊对微生物菌液具有一定的保护作用（图 7-a）。不同温度条件下液体菌剂和微胶囊菌剂菌株生长差异显著（图 7-b）。2 种剂型的菌株浓度随温度的升高表现出先升高后降低的趋势。温度为 30℃ 时，液体菌剂和微胶囊菌剂菌株 OD₆₀₀ 均达到最高，分别为 1.65 和 1.68。各温度条件下，微胶囊菌剂的菌液浓度均高于液体菌剂。2 种剂型的最适 pH 均为 7.0（图 7-c），但微胶囊菌剂 OD₆₀₀ 在 pH 7.0 时显著高于液体菌剂，分别为 1.70 和 1.59。各 pH 条件下微胶囊菌剂的菌株浓度均高于液体菌剂，表明微胶囊菌剂能够在过酸或过碱条件下保护菌株。液体菌剂和微胶囊菌剂的菌株浓度随着存储时间的增加而增加（图 7-d），并在 48 h 时达最大值，OD₆₀₀ 分别为 1.39 和 1.43。随后 2 种菌剂的菌体浓度开始降低，但微胶囊菌剂的菌株浓度显著高于液体菌剂，表明微胶囊在长时间存储中对菌株具有保护作用，可以延长菌株的存活时间。盐胁迫条件下，2 种剂型的 OD₆₀₀ 值随着盐浓度的增加先升高后下降，在 NaCl 质量浓度为 1.0% 时，液体菌剂和微胶囊菌剂的菌株浓度均达最大值，OD₆₀₀ 分别为 0.46 和 0.54。在不同盐浓度处理下，微胶囊菌剂的 OD₆₀₀ 值均高于液态菌剂，表明微胶囊菌剂能够在高盐和高渗透压下保护菌株（图 7-e）。

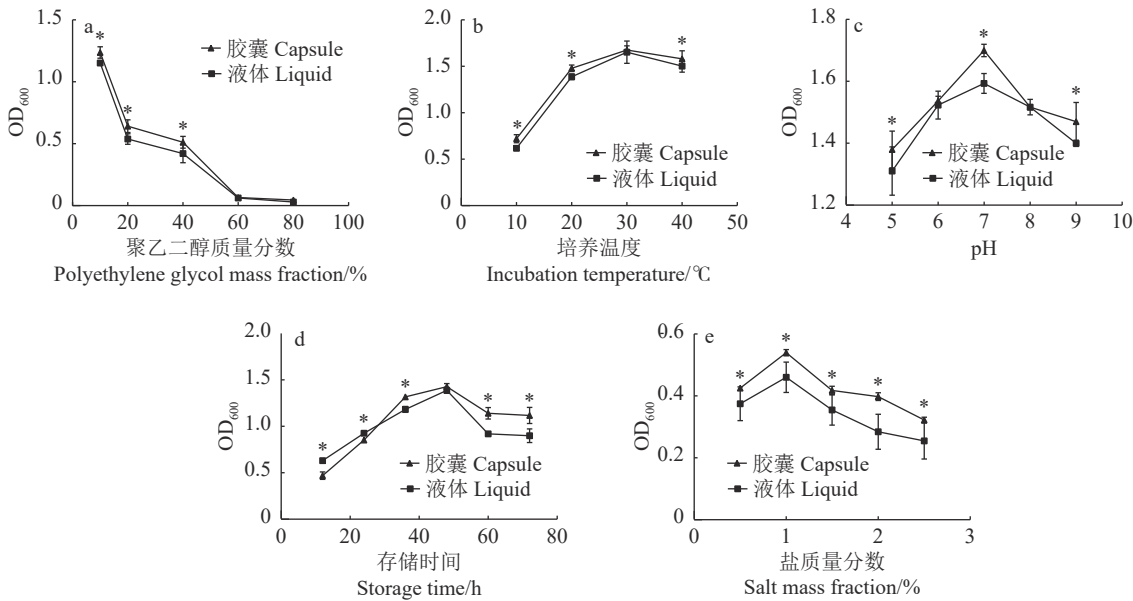
2.7 PGPR 微胶囊菌剂对玉米生长的影响

PGPR 微胶囊菌剂对玉米生长的影响结果如图 8 所示。接种液体菌剂（JY）和微胶囊菌剂（JN），玉米株高、苗干重和根干重均显著高于空白（CK）

表 4 微胶囊菌剂颗粒的理化性质
Table 4 Physicochemical properties of microcapsules

配比组合 Varied combination	直径 Diameter/mm	机械强度 Mechanical Strength/g	增殖前胶囊活菌数 Number of viable cells before proliferation/ ($\times 10^9$ cfu·g ⁻¹)	包埋率 Embedding rate/%	增殖后胶囊活菌数 Number of viable cells in after proliferation/ ($\times 10^9$ cfu·g ⁻¹)	增殖倍数 Multiplication ratio
SA1%-CaCl ₂ 2%	3.14±0.13b	3.29±0.16b	1.01±0.11b	85.60±2.25b	5.68±0.37b	5.62
SA1%-CaCl ₂ 3%	3.11±0.07c	3.21±0.13c	1.12±0.03c	91.27±1.05c	8.73±0.50c	7.79
SA2%-CaCl ₂ 2%	3.22±0.04a	3.35±0.03a	1.20±0.03a	81.17±1.91a	6.91±0.49a	5.76

同列数据后不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)
Data with different letters on same column indicate significant differences ($P<0.05$).

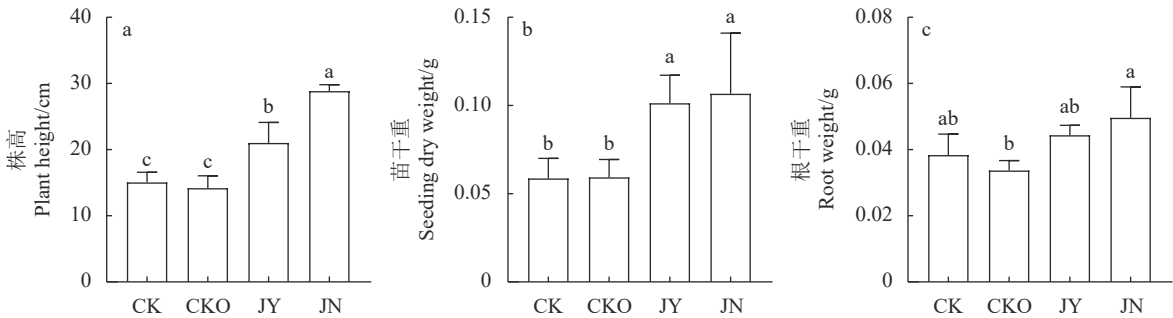


* 表示两组之间差异显著 ($P<0.05$)
* indicates significant difference ($P<0.05$).
图 7 不同环境条件对两种剂型菌株生长的影响

Fig. 7 Effect of environmental conditions on proliferation of PGPRs in two different dosages

和空胶囊 (CKO) 处理组 ($P<0.05$)。JN 处理组对比 CK 组, 玉米株高、苗干重和根干重分别增加 91.83%、81.82% 和 29.57%。2 种菌剂对玉米生长的影响在部分生理指标上差异显著。玉米株高表现为

JN 组显著高于 JY 组 ($P<0.05$), 株高增加 37.30%。JN 组玉米苗干重和根干重均高于 JY 组, 分别增加 5.26% 和 12.03%, 但差异不显著 ($P>0.05$)。表明微胶囊菌剂和液体菌剂均有显著的玉米促生作用,



a: 株高; b: 苗干重; c: 根干重; 不同小写字母表示不同组别间差异显著 ($P<0.05$)。
a: plant height; b: dry weight; c: root dry weight; data with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 8 不同剂型 PGPR 对玉米生长的影响

Fig. 8 Effect of PGPR dosage on growth of corn plants

但微胶囊菌剂对玉米株高的促生作用优于液体菌剂。

2.8 PGPR 微胶囊菌剂对玉米根系形态的影响

PGPR 微胶囊菌剂对玉米根系形态影响的结果见图 9。结果表明，JY 组和 JN 组，玉米总根长、根表面积、根平均直径、根体积和根尖数显著高于 CK 组和 CKO 组 ($P<0.05$)。对比 CK 组，JN 组玉米总根长、根表面积、根平均直径、根体积和根尖数分别增加了 84.39%、81.87%、87.28%、82.45% 和 62.20%。

JY 组和 JN 组总根长 (图 9-a) 和根表面积 (图 9-b) 有显著差异。对比 JY 组，JN 组的玉米总根长和根表面积分别增加了 29.94% 和 40.68% ($P<0.05$)。其他玉米根系形态指标包括根平均直径、根体积和根尖数 (图 9c~e)，JN 组均高于 JY 组，分别增加了 37.30%、25.37% 和 14.35%，但差异不显著 ($P>0.05$)。这表明，微胶囊菌剂和液体菌剂对玉米根系均有显著的促生作用，但微胶囊菌剂对总根长和根表面积的促生作用优于液体菌剂。

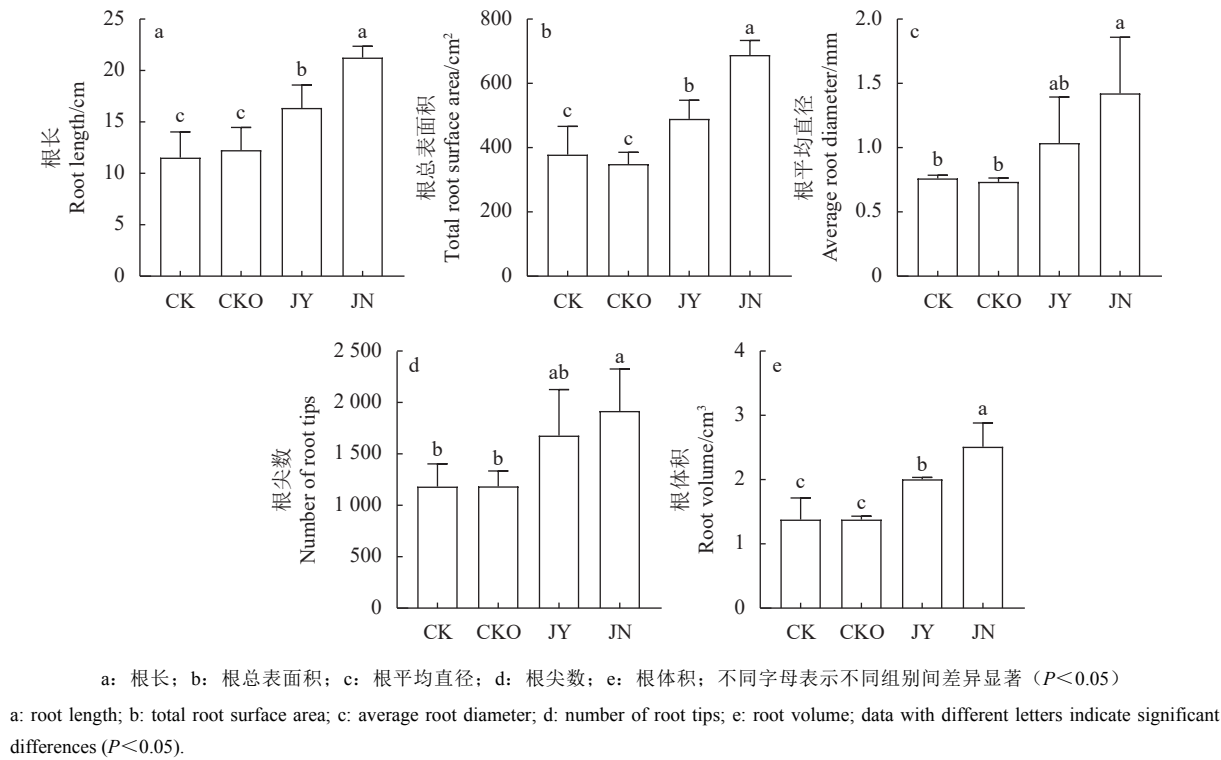


图 9 不同剂型 PGPR 对玉米根系形态的影响

Fig. 9 Effect of PGPR dosage on root morphology of corn plants

3 讨论与结论

微胶囊化技术是农业领域备受关注的一项新兴技术^[20]。微胶囊技术具有良好的稳定性、分散性和缓释性，在农产品保鲜、药物控释等方面显示出广阔应用前景。PGPR 微胶囊菌剂不仅能增强微生物的活性，还具备出色的缓慢释放特性，因此具有巨大的发展潜力^[21]。本研究对微胶囊的操作性和成球性进行了全面的评估，测量了活菌数量、包埋率和增殖倍数，并确定了微胶囊菌剂的最佳制备配比。所制备的 PGPR 微胶囊菌剂活菌数量达 8.73×10^9 cfu·g⁻¹，具有优良的耐热、耐盐、耐酸碱、耐干旱特性，适宜保存和运输。

在土壤中使用微生物菌剂时，菌株在复杂的土壤环境中的生存能力变得至关重要^[22]。随着多样的

微生物肥料的出现，传统的剂型已不能满足人们对微生物肥料的需求，因此迫切需研发新的菌剂剂型^[23]。利用微胶囊菌剂可以有效地延长菌株在土壤中的生存时间，并确保菌剂在植物根部区域稳定施展其作用。研究发现，微胶囊技术不仅提升了菌体对于干旱和盐碱的抵抗能力，而且在复杂土壤环境中展现出卓越的生存力。本研究证实，微胶囊菌剂不仅增强了菌体对于干旱胁迫的耐受性，同时也提升了它们对高盐环境的耐受能力，因此微胶囊技术的应用成为提高微生物肥料效能的重要途径。

微生物菌剂是一种有前途的生物肥料。近几十年来，许多研究发现微生物菌剂具有促进作物生长和增加产量的效果^[24]。然而微生物菌剂的促生作用主要来源于有益微生物群落而不是单个菌株，因此微生物群落可能更有效促进植物生长^[25]。车永梅

等^[26]从盐渍化土壤中筛选到 2 株耐盐菌, 2 株菌株的复合菌剂可显著促进盐胁迫下烟草的生长。Anzuay 等^[27]用 2 株菌株共接种玉米, 发现复合菌液显著促进玉米生长并提高了玉米的磷含量。沙月霞等^[28]研究发现 3 株芽孢杆菌混合使用对玉米具有显著的预防土传病和促生作用。

本研究从分离到的 50 株根际促生菌中确定了 2 株促生能力优良且互不拮抗的 PGPR。以混合菌液制备成的微胶囊菌剂对玉米株高、苗干重、根干重具有显著的促生作用。用于微胶囊菌剂的载体材料-包埋剂 SA 对玉米的生长和根系形体未表现出显著影响, 表明 SA 作为微胶囊菌剂的载体是可行的。SA 对微生物菌剂的代谢和促生作用均无显著影响, 是一种对环境、植物和微生物无害的环保材料, 在微生物肥料研究与制备方面有一定潜力^[29]。由于本试验在实验室稳定条件下进行, PGPR 和微胶囊菌剂能否在田间土壤复杂的生态条件以及诸多生物与非生物因素影响下稳定发挥促生作用仍需要进一步验证。

参考文献:

- [1] MAHAPATRA S, YADAV R, RAMAKRISHNA W. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(5): 3543–3562.
- [2] KESAVAN P C, SWAMINATHAN M S. Modern technologies for sustainable food and nutrition security [J]. *Current Science*, 2018, 115(10): 1876.
- [3] RAKLAMI A, BECHTAOUI N, TAHIRI A I, et al. Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1106.
- [4] WU Z S, GUO L N, QIN S H, et al. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(2): 317–327.
- [5] 项郑昊, 周化岚, 张建国. 海藻酸钠微胶囊制备及其在微生物包埋中的应用 [J]. *工业微生物*, 2021, 51 (1): 43–49.
- XIANG Z H, ZHOU H L, ZHANG J G. Preparation of alginate microcapsules and its application in industrial microbiology [J]. *Industrial Microbiology*, 2021, 51(1): 43–49. (in Chinese)
- [6] 董羽嘉, 何艳慧, 武占省. 微胶囊化植物根际促生菌剂的研究进展 [J]. *生物加工过程*, 2021, 19 (4): 404–412.
- DONG Y J, HE Y H, WU Z S. Research progress of microencapsulated plant growth promoting rhizobacteria [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2021, 19(4): 404–412. (in Chinese)
- [7] 徐致远, 郭本恒, 陈卫. 乳酸菌微胶囊技术的研究进展 [J]. *乳业科学与技术*, 2005, 28 (5): 198–201.
- XU Z Y, GUO B H, CHEN W. The development of micro-encapsulation technology applied in LAB production [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2005, 28(5): 198–201. (in Chinese)
- [8] 陈妮娜, 朱亚燕, 阳丽媛, 等. 海藻酸钠-果胶改性复合膜的制备及表征 [J]. *中国食品添加剂*, 2018, (4): 154–163.
- CHEN N N, ZHU Y Y, YANG L Y, et al. Preparation and characterization of cross-linking composite films based on sodium alginate and pomelo pectin [J]. *China Food Additives*, 2018(4): 154–163. (in Chinese)
- [9] 张琳, 尚校兰, 李秋玲, 等. 海藻酸钠-多聚赖氨酸复合益生菌微胶囊的构建及性能评价 [J]. *饲料博览*, 2023, (2): 30–35.
- ZHANG L, SHANG X L, LI Q L, et al. Construction and performance evaluation of sodium alginate poly-L-lysine compound probiotics microcapsule [J]. *Feed Review*, 2023(2): 30–35. (in Chinese)
- [10] 靳海洋, 王慧, 张燕辉, 等. 基于基因组的一株土壤固氮菌分离菌株鉴定及其促生作用 [J]. *微生物学报*, 2021, 61 (10): 3249–3263.
- JIN H Y, WANG H, ZHANG Y H, et al. Genome-based identification and plant growth promotion of a nitrogen-fixing strain isolated from soil [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3249–3263. (in Chinese)
- [11] 黄臣, 杨凯元, 高鹏, 等. 达乌里胡枝子根际解磷细菌的筛选、鉴定及特性研究 [J]. *草地学报*, 2022, 30 (9): 2345–2355.
- HUANG C, YANG K Y, GAO P, et al. Screening, identification and characteristics of phosphate-solubilizing microorganisms in *Lespedeza daurica* [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(9): 2345–2355. (in Chinese)
- [12] 孟丽媛, 邱涵, 谢瑾, 等. 解磷菌、解钾菌和固氮菌的分离筛选与鉴定 [J]. *生物灾害科学*, 2022, 45 (2): 241–246.
- MENG L Y, QIU H, XIE J, et al. Isolation, screening and identification of phosphorus-solubilizing bacteria, potassium-solubilizing bacteria and nitrogen-fixing bacteria [J]. *Biological Disaster Science*, 2022, 45(2): 241–246. (in Chinese)
- [13] 陈越, 李虎林, 朱诗苗, 等. 产吲哚乙酸 (IAA) 促生菌的分离鉴定及对烟草种子萌发和幼苗生长发育的影响 [J]. *作物杂志*, 2020, (2): 176–181.
- CHEN Y, LI H L, ZHU S M, et al. Isolation and identification of IAA-producing rhizobacteria and its effects on seed germination and seedling growth of tobacco [J]. *Crops*, 2020(2): 176–181. (in Chinese)
- [14] 葛淼淼, 薄永琳, 刘宸, 等. 土壤产铁载体细菌的筛选及其对铁氧化物的活化与利用 [J]. *微生物学通报*, 2023, 50 (3): 1062–1072.
- GE M M, BO Y L, LIU C, et al. Screening of soil siderophore-producing bacteria and their activation and utilization of iron oxide [J]. *Microbiology China*, 2023, 50(3): 1062–1072. (in Chinese)
- [15] 韩坤, 田曾元, 刘珂, 等. 具有 ACC 脱氨酶活性的海滨锦葵 (*Kosteletzkya pentacarpos*) 内生细菌对小麦耐盐性的影响 [J]. *植物生理学报*, 2015, 51 (2): 212–220.
- HAN K, TIAN Z Y, LIU K, et al. Effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity in *kosteletzkya pentacarpos* on wheat salt tolerance [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(2): 212–220. (in Chinese)

- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-379.
- [17] 韩梅, 李天华, 彭帅, 等. 微生物肥料的包埋固定化研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18 (4): 999-1005.
HAN M, LI T H, PENG S, et al. Immobilization of microbial fertilizer in small spherical particles by embedding [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, 18(4): 999-1005. (in Chinese)
- [18] 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25 (7): 1342-1346.
XUE W M, YU W T, LIU X D, et al. Chemical method of breaking the cell-loaded sodium alginate/chitosan microcapsules [J]. *Chemical Research In Chinese Universities*, 2004, 25(7): 1342-1346. (in Chinese)
- [19] 李琦, 姚拓, 阿不满, 等. 根际促生菌微胶囊剂研发及对苜蓿、燕麦促生效果评价 [J]. 草地学报, 2019, 27 (5): 1392-1399.
LI Q, YAO T, A B M, et al. Development of plant growth promoting rhizobacteria microcapsules and evaluation of its growth promotion effects on alfalfa and oats [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2019, 27(5): 1392-1399. (in Chinese)
- [20] 韩梅. 大豆复合微生物肥料功能菌系的构建及包埋固定化研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013
HAN M. Studies on Construction and Immobilization of Functional Flora for Compound Microbial Fertilizer in Soybean[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [21] 朱峰, 许春丽, 曹立冬, 等. 农药微囊剂及其制备技术研究进展 [J]. 现代农药, 2018, 17 (2): 12-16,33.
ZHU F, XU C L, CAO L D, et al. Research advances of pesticide microcapsule and its preparative technique [J]. *Modern Agrochemicals*, 2018, 17(2): 12-16,33. (in Chinese)
- [22] BASU A, PRASAD P, DAS S N, et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects [J]. *Sustainability*, 2021, 13(3): 1140.
- [23] AINI N, YAMIKA W, ULUM B. Effect of nutrient concentration, PGPR and AMF on plant growth, yield, and nutrient uptake of hydroponic lettuce [J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2019, 21(1): 175-183
- [24] GAMEZ R, CARDINALE M, MONTES M, et al. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla) [J]. *Microbiological Research*, 2019, 220: 12-20.
- [25] KUMARI G, KUMAR D, SINGH D, et al. Characterization of microbial inoculants and its different formulation for mass production [J]. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2020, 9(7): 621-627.
- [26] 车永梅, 刘广超, 郭艳苹, 等. 一种耐盐复合菌剂的制备和促生作用研究 [J]. 生物技术通报, 2023, 39 (11): 217-225.
CHE Y M, LIU G C, GUO Y P, et al. Preparation of compound halotolerant bioinoculant and study on its growth-promoting effect [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 217-225. (in Chinese)
- [27] ANZUAY M S, CIANCIO M G R, LUDUEÑA L M, et al. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides [J]. *Microbiological Research*, 2017, 199: 98-109.
- [28] 沙月霞, 邢敏, 李明洋, 等. 微生物菌剂拌土对玉米茎基腐病的预防和促生效果 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (4): 141-144,154.
SHA Y X, XING M, LI M Y, et al. Preventive and promoting efficacy of microbial agents mixed with soil against the maize stem basal rot in Ningxia [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(4): 141-144,154. (in Chinese)
- [29] 王礼, 杨光, 杨波, 等. 海藻酸钠微球的制备优化及其吸附模型 [J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42 (8): 103-111.
WANG L, YANG G, YANG B, et al. Optimization of preparation of sodium alginate microspheres and its adsorption behavior modeling [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2023, 42(8): 103-111. (in Chinese)

(责任编辑: 黄爱萍)