

生物膜微生物肥料：一个新方向

益禾箭生物技术公司编译组

摘要

微生物群落附着在表面上，或者说生物膜，已经在包括土壤在内的许多环境中发现。本章描述了开发生物膜作为生物肥料在作物生产中的潜在应用。通过细菌在生物真菌表面的定植形成真菌-细菌生物膜(FBBs)，与单一培养相比，生物膜增强了代谢活性。将一株固氮根瘤菌与FBBs结合，形成根瘤菌生物膜(FRBs)已被证明可以提高生物膜在氮缺乏环境下、以及在生物肥料和生物防治生物膜接种物的生产上都有潜在的应用。与单纯接种根瘤菌的常规接种相比，研制的FRB生物膜接种剂能显著提高大豆中固氮量约30%。与常规接种相比，FBB和FRB使水稻早期生物量增加约25%。最近也观察到FRBs在小麦根部定植形成假结瘤。直接接种FRBs可提高土壤氮、磷的有效性。他们还改善了矿石磷的生物溶解性。与未形成生物膜的单一或混合培养相比，有益内生菌的FBBs产生了更高的酸度和促进植物生长的激素。这说明用有效微生物的常规接种物的植物接种，可能不能达到最高的微生物功效，所以只能用生物膜接种。

引言

某些微生物可以附着在生物或非生物表面上，并分化形成复杂的、多细胞的群落，称为生物膜。生物膜由微生物细胞(藻类、真菌、细菌和/或其他微生物)加上细胞产生的细胞外生物聚合物(称为胞外聚合物(EPS))组成，为群落提供结构和保护。这些群落可以在医疗、工业和自然环境中找到。它们也可以为各种生物技术的应用在体外被设计出来。

微生物在从浮游(自由游动)生物转变为复杂的附着于表面的生物膜一部分的细胞过程中发生了深刻的变化。基因和调控回路对于初始细胞-表面相互作用、生物膜成熟和生物膜微生物返回浮游生长模式都很重要。与非生物膜形成阶段不同，生物膜具有独特的基因表达模式。

体外开发的有益生物膜的作用特性已经显示出潜力，为微生物生物技术的应用带来众多有利影响。它们在农业和环境、酶技术、药物挖掘研究和绿色能源研

究中的应用，正在调查中。本章讨论了生物膜作为生物肥料的应用，并对其作为下一代生物肥料的应用前景进行了初步论证。

土壤中的生物膜

土壤中主要存在三种类型的生物膜:细菌(包括放线菌)、真菌和 FBBs。细菌和真菌的生物膜形成于土壤中的非生物表面。在 FBBs 中，真菌充当细菌粘附的生物表面(图 1)。就非丝状真菌而言，细菌和真菌都可以作为生物表面。与单菌接种相比，通过细菌在生物真菌表面定植的 FBBs 形成，使生物膜的代谢活性增强，可能也增强了非生物表面上的多物种细菌或真菌性生物膜。这种在细菌和菌根真菌之间的微生物联系已经被观察到可在土壤中自然发生，并促进菌根共生。附着在某些作物根部的生物膜有助于养分循环和病虫害的生物防治，从而提高农业生产率。然而，由于土壤中生物膜的密度不足以产生最大的有益效果，体外开发的



由细菌细胞附着于真菌丝形成的真菌-细菌生物膜(FBB)显微图。

生物膜应作为接种剂来促进植物生长。

生物膜生物肥料

随着普通的非菌根土壤真菌和根瘤菌之间的相互作用，并形成 FRBs 的首次体外发育和观察，一系列的研究被开展，以论证它们在不同方面的潜在应用。通过固氮酶活性和氮积累，可以观察到 FRBs 可以生物固定氮 (N_2)，这与单一栽培根瘤

菌菌株形成了对比。本文使用的根瘤菌是慢生根瘤菌 *elkanii* SEMIA 5019, 它是一种具有高固氮能力的大豆结瘤菌株。

与只含根瘤菌的常规接种剂相比, 开发的 FRB 生物膜接种剂的应用, 可显著提高大豆的固氮能力(约 30%)。最近的另一项研究表明, 开发的生物膜接种剂在增强有机酸释放和植物生长促进(PGP)物质方面的作用, 导致水稻生长早期的植株干重比传统的单培养接种剂增加约 25%。与单一栽培相比, 旱作麦田中共接种 PGP 根际细菌和丛枝菌根真菌, 可产生最高的谷物蛋白质含量。近年来, 人们对生物膜接种剂在小麦根上形成 FRB 进行了初步观察。

FRBs 可以作为假结瘤, 将 N_2 固定在非豆科植物的根上。在 Bashan(1998) 关于农业微生物接种的综述中, 已报道了用丛枝菌根真菌和固氮菌混合接种产生协同作用的情况。这种协同作用的可能结果包括, 显著增加植物的生长和磷含量, 增强菌根感染和改善对磷、氮、锌、铜和铁等营养物质的吸收。这些接种剂通过一系列机制促进植物生长, 改善养分获取和抑制真菌植物病原体。当直接施用于土壤时, 与单一栽培相比, FRBs 的氮、磷有效性分别提高了约 2 倍和 15 倍, 即使在非常高的土壤 NO_3^- 浓度下, FRBs 也表现出较高的固氮酶活性。

生物膜接种剂可有效地用于磷矿的生物溶解。这是通过从青霉菌、平菇和墨西哥黄粉菌(一种地衣真菌)中培养出的生物膜来实现的, 与只培养真菌相比, 这种地衣真菌增加了磷的溶解量约 230%。此外, 该生物膜接种剂还可用于成功地在植物中引入有益微生物, 用于疾病的生物防治等。在体外, 一种平菇的荧光假单胞菌生物膜证实了这一点, 与单独接种荧光假单胞菌相比, 荧光假单胞菌增加了番茄内生菌定植率超过 1000%。荧光假单胞菌是一种生物防治剂。因此, 多种形式的生物膜接种, 可以满足未来提高作物产量的需求, 增加 N_2 固定量、养分吸收和生物防治疾病。

已观察到, 有益内生菌的 FBBs 比没有形成生物膜的单一或混合培养, 产生更高的酸度和 PGP 激素。较高的酸度对病原菌的抑制通常很重要。此外, pH 值与在 FBBs 液体培养基中类吡啶乙酸物质的产生之间有显著负相关, 但在没有大量微生物集合的生物膜形成的混合培养中, 没有这种关系(图 3)。因此, 当生物膜形成, 高酸度反映了 IAAS 的产生。因此, 最高的微生物效果可能不是通过单一培养或有效微生物的混合培养来实现的, 而是通过生物膜接种。

在微生物单一栽培的常规接种技术中，由于各种环境胁迫因素的影响，引入的微生物在土壤中生存能力差是一个有待解决的主要问题。研究发现，与单种根瘤菌相比，生物膜接种剂帮助根瘤菌在高盐度(400 mM NaCl)和高单宁浓度(0.4 mM 单宁酸)下分别存活 100000 倍和 12 倍。对低 pH、铬和蚯蚓捕食的耐受性较单一栽培高。据报道，微菌落的形成和毒素的产生是可以使细菌生物膜(如铜绿假单胞菌)抵抗原生动物牧食的有效机制，从而可在应用环境中持续存在。Burmölle 等人(2006)的类似观察表明，在多物种生物膜中，协同作用会增强生物膜的形成，增加对抗菌剂的耐药性。通过耐药细胞的形成，细菌细胞在生物膜中被保护起来免受抗菌剂的影响，耐药细胞是一种由生物膜最外层细胞的一小部分所采用的高度保护状态。

结论及未来研究需要

这里报道的研究表明，FBBs/FRBs 在生物性能上比单一或混合微生物培养，可能也比在非生物表面的多物种细菌或真菌生物膜更有效。如果要在营养贫乏的土地上维持土壤肥力，并在没有根瘤菌的情况下改善土壤中根瘤菌的生存，施用 FRBs 作为生物膜接种剂似乎很重要。然而，这种生物技术的应用是稀缺的，因为它的研究仍然不足。选择高效、同时施肥和生物防治的微生物组合是该技术未来研究的关键。因此，应在实验室和大田条件下进行更多的研究，以优化各种作物的生物膜接种。