

Preliminary Discussion on Problems of *Rhizobium* Inoculants

Jianfeng Li^{1,2}, Shuqing Zhang^{1,2*}, Jianxiong Du³, Han Han¹, Lili Zhang¹

¹Key Laboratory of Guizhou Bioresource Development and Utilization/Institute of Soil and Environment Bioremediation in Karst Habitats, Guizhou Normal College, Guiyang Guizhou

²Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu

³Guizhou University of Finance and Economics, Guiyang Guizhou

Email: *smartclover@foxmail.com

Received: Feb. 26th, 2015; accepted: Mar. 8th, 2015; published: Mar. 11th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Rhizobium is found excellent in promoting growth and yield of legume crops, which decreases the cost of agricultural production and the side effect of chemical fertilizer application. Currently, *Rhizobium* inoculants have not been widely used in agriculture. Currently, the practical applications of *Rhizobium* are restricted by quality factors of some inoculants. In this paper, we discussed briefly the factors such as low strain breeding efficiency of *Rhizobium*, serious contamination and short shelf life of inoculants, to provide some reference to the further research and application of commercial *Rhizobium* inoculants.

Keywords

Rhizobium, Commercial Inoculants, Contamination, Product Quality

根瘤菌剂现存问题初探

李剑峰^{1,2}, 张淑卿^{1,2*}, 杜建雄³, 韩 晗¹, 张丽丽¹

¹贵州师范学院, 贵州省生物资源开发利用特色重点实验室, 喀斯特生境土壤与环境生物修复研究所, 贵州 贵阳

²甘肃农业大学, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州

³贵州财经大学, 贵州 贵阳

Email: *smartclover@foxmail.com

*通讯作者。

收稿日期：2015年2月26日；录用日期：2015年3月8日；发布日期：2015年3月11日

摘要

根瘤菌有促进豆科作物生长及产量的作用，能减少施用化肥带来的副作用并降低农业生产的成本。目前，根瘤菌的实际应用受到部分菌剂产品质量因素的限制。本文就商用根瘤菌剂应用中遇到的菌种选育效率低、菌剂污染率高、有效期短等问题予以探讨，为根瘤菌剂的深入研究和应用提供一些参考。

关键词

根瘤菌，商用菌剂，污染，产品质量

1. 引言

菌剂类肥料通常指以菌种活体及其代谢物改善植物营养条件，对植物的生长、发育或有效成分有促进作用的一类特殊生物制品[1]。根瘤菌剂作为应用时间最长、最为广泛的菌剂类产品，对于减少化肥施用量、提高豆科作物的品质有良好的作用。但目前，根瘤菌剂在国内的发展和应用也面临着一些问题。许多菌剂产品在实验室的栽培试验中促生能力表现突出，但经过规模化生产、包装，经历货架期进入田间施用应用时，增产效果却不能达到预期的效果。一方面菌种退化会导致结瘤能力下降，另一方面一些根瘤菌剂在使用说明或包装上未对菌种的互接种族特性进行明确的描述，所含菌种无法侵染非互接族的豆科作物形成根瘤[2]。更重要的是菌种的选育和菌剂制备过程缺乏谨慎的验证和优化，一些未经验证的外源营养或功能性添加剂对菌种自身的性状有一定的影响，甚至可能诱发菌种变异，加速菌种退化。经初步调查，市售菌剂中仅有少数产品的菌种经过正规的申报鉴定程序，而一些不具备研发和质量监控能力的厂家在生产中并不重视菌种的更新选育和生产环境的洁净度控制。这就导致市场上的根瘤菌剂类目繁多，但品质良莠不齐，肥效的不确定性让使用者望而却步。本文就长期以来商用根瘤菌剂存在的一些问题进行归纳，旨在为根瘤菌剂的生产和发展提供一些参考。

2. 根瘤菌剂存在的主要问题

商用根瘤菌剂产品能否顺利地走向市场，分别基于下列因素：(1) 根瘤菌剂产品实际增产效果[3]；(2) 产品的生产成本；(3) 根瘤菌剂的有效活菌数和菌剂有效期[4]；根据国内外根瘤菌剂近一个世纪的生产和应用，商用的根瘤菌剂产品面临的主要问题包括：(1) 商用菌剂中活菌数目不足；(2) 根瘤菌剂的污染率高且有效期过短[5]；(3) 在长期种植豆科作物的地区，部分菌剂的占瘤率过低，菌剂产品缺乏相应的详细说明书对施用方法进行指导；(4) 菌剂中菌种肥效单一，缺乏竞争力；(5) 其他如产品施用配套技术、施用条件及产品知识产权保护方面存在的问题。

3. 活菌数目不足

对以活菌菌体作为主要成分的菌剂产品进行评价，统一的标准是活菌数目，即有效菌数。保证有充足的活菌侵染豆科作物结瘤是实现增产的前提，是菌剂内环境保持稳定菌种活力得以保障的外在表现，也是菌剂产生经济效益的基本条件。但有效菌数过低仍是现今商用根瘤菌剂中普遍存在的现象[6]。Olsen等(1995) [7]发现北美 40 种菌剂产品在临近有效期结束时，菌剂的活菌数并不理想。只有一种菌剂中的根瘤菌数高于杂菌，而其他菌剂中的 4 份样品以 MPN (standard most-probable-number, 最大可能菌数)法无

法检测出根瘤菌。Gomez 等(1997) [8]对阿根廷主要菌剂厂商的近 20 种菌剂的质量进行检测,指出虽然所有菌剂都含有具备优秀固氮能力的根瘤菌,但活菌数目均低于巴西国家标准。这主要源于菌剂内环境的改变和杂菌的污染。后者多因生产、包装和运输环节的监管和控制不力,即便各国的科研和质检部门提供了多种用于活菌数目检测和菌剂质量监控的方法和流程,但一些厂商还是不愿花费成本和精力进行严格的产品质量监控[9]。鉴于此,各国政府相继制订强制性标准来确保菌剂的活菌数,从 5×10^7 到 1×10^9 个活菌/克菌剂不等[9]。法国对根瘤菌剂制订了最严格的质量标准,并要求对新上市产品进行统一的田间试验[10]。加拿大要求菌剂拌种后,至少达到小粒和大粒种你别附着 10^3 和 10^5 个活菌;在田间接种则要求每公顷至少 10^{11} 个活菌[11];中国于 2000 年也颁布了根瘤菌肥料质量标准 NY227-2000,要求每克菌剂中的有效活菌数不得低于 5×10^8 个[12]。

4. 菌剂污染率及有效期

除菌剂内环境的偏酸、偏碱或有毒代谢物积累或以外,杂菌污染是造成根瘤菌数过低的主要原因[6] [7] [9]。Schwartz 等(2006)指出,根瘤菌剂应尽可能的避免病原和杂菌的污染[5]。作为储存并维持菌种生活的场所,根瘤菌剂内环境及储运环节都有适宜菌体生存繁殖的养分、湿度和温度等条件[5]。菌剂在生产和贮运过程中[13],一些包装上的瑕疵及破损成为外界环境中杂菌的侵入通道,一旦污染则可能损失整批次或整包装的菌剂产品,而当杂菌侵入后没有相应的抑菌措施,杂菌率很容易超标上千倍[14]。有研究指出:杂菌不但会与根瘤菌争夺养分和环境、还能产生大量有毒的代谢物降低菌种的生活力,使其大量死亡[7]。Olsen 等(1995)调查发现:北美约 40 种的市售菌剂在存放 1~2 年后,细菌、放线菌和真菌的数量分别达到 $10^9 \sim 10^{10} \text{ g}^{-1}$ 、 $10^8 \sim 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $10^5 \sim 10^7 \text{ g}^{-1}$ [7],只有一种菌剂中的根瘤菌数超过杂菌数,而部分菌剂中杂菌数目超出根瘤菌上千倍。一些菌剂在污染后也无法由人眼直接识别,用于田间后才发现结瘤能力下降,但此时损失已无法挽回[15]。此类问题在全球范围内普遍存在,受害的中小型种植者遭遇风险后对根瘤菌剂失去信心,一些优质菌剂的市场也因此被破坏[6]。因此,菌剂的污染率限制被写入各国菌剂质量标准中最重要也最醒目的位置。肯尼亚和津巴布韦限定根瘤菌剂的污染率必须小于 10%,澳大利亚政府要求菌剂污染率必须低于 0.1% [16],卢旺达限定菌剂杂菌率必须低于 0.001% [17],我国现行的微生物肥料标准(2006)要求菌剂产品的杂菌率低于 10%,专门的根瘤菌剂标准 NY227-2000 则要求杂菌率低于 10% [12]。菌剂污染率一方面由市场和政府进行监控,更多的是菌剂制造商的工艺改进和严格自律[18]。目前降低污染率的主要措施包括:(1) 使用严格灭菌的载体基质;(2) 严密封装,通过控制生产运输环境的净度降低杂菌的侵入几率[9];(3) 使用冻干剂型,创造利于菌种休眠而不利于杂菌繁殖的环境;(4) 菌剂低营养化,以无营养材料吸附[19];(5) 以高分子材料或矿物质固定化包埋菌体细胞[14]。以上方法都已取得了明显的效果并为企业所使用,但也存在一些问题,如包埋和控制环境净度对设备和工艺有一定要求,会使菌剂成本居高不下[17]。冻干或低营养化菌剂也会因温度巨变或养分不足而损失相当比例的活菌,降低菌剂的有效菌数[20]。

菌剂商品化要求其产品有足够长的有效期,而现有菌剂的有效期过短也是亟待解决的问题。除冻干剂型中的菌种基本处于休眠状态外,其它菌剂中根瘤菌都处在自由繁殖和生长的环境,短时间内的大量增殖,极易引起菌种因传代次数过多而退化。在旺盛的增殖期,营养迅速耗尽也会造成菌体大量死亡。目前国内大多数厂商采用临期或短期订单的产销模式,以避免在生产和贮运中闲置,从而保证菌种的活力和数量[21]。但由于菌剂的使用受作物生长期和栽培计划的影响,仅仅依靠临期或短期订购会使企业的发展受到限制,中小企业更无法抵御依赖短期行为生存的风险。因此正规产品只有 4~5 家实力雄厚的企业拥有生产根瘤菌剂的许可证,且只能季节性的根据订货安排生产。这一现状造成现有根瘤菌剂的研究和应用往往脱节,优良的菌种不能及时得到应用。

5. 苜蓿根瘤菌剂的结瘤竞争能力

我国 2009 年起实行的《根瘤菌生产菌株质量评价技术规范》(NY/T 1735-2009)中,对菌种固氮能力和增产效果有了明确的规定,即籽粒和植株收获物的总氮增加量分别增加 20%和 15%以上,与未接种的对照相比,籽粒和植株产量分别增产 10%和 5%以上[22]。作为一类特殊的菌剂产品,根瘤菌剂中的菌体首先要与施用对象属于同一互接族[2],同时要具备有效侵染宿主植株的侵染能力,直到与宿主形成根瘤后才能发挥作用。此时目标菌种与土著根瘤菌的竞争就成为菌剂肥效的决定性因素[14]。在长期栽培豆科作物的农田土壤中未接种菌剂的植株也会形成根瘤,而施用根瘤菌剂后豆科作物的增产效果并不理想,远远低于在未种植过豆科作物的土壤中施用菌剂的增产效果[23]。适应当地环境的土著根瘤菌往往较新引入的菌种竞争能力更强,但结瘤能力和固氮效率却经常低于人工选育的优良菌株[24]。因此,提高接种菌株的竞争结瘤能力也是提高菌剂肥效的途径之一。Kumar 和 Chandra (2008)对豌豆植株同时接种豌豆根瘤菌和根际促生菌 *Bacillus megaterium* 和 *Kurthia sp.*, 较单独接种根瘤菌,45 d 和 90 d 后,混合接种处理下目标根瘤菌的占瘤率分别增加 4.7%和 42.3% [25]。李剑峰(2009)等从红豆草植株上的根瘤中分离到多个根瘤菌株后,筛选出其中固氮能力和占瘤率最高的菌株进行增效诱变,得到的突变株占瘤率不变,但对宿主的促生能力较原始菌株提高 25.58% [26]。这些研究表明混合其他菌种接种,以打破土著根瘤菌-接种根瘤菌间的结瘤竞争平衡,或从土著根瘤菌中获得优良的菌株并加以驯化或增效选育,也是保持占瘤率,提高菌种促生效果的途径。

6. 根瘤菌剂的功能单一性

长期以来,根瘤菌剂的功能和作用被认为只存在于结瘤固氮的过程之中,因此其作用的单一性成为限制菌剂发展的重要因素[27]。仅依靠结瘤固氮的根瘤菌剂与兼备溶磷、解钾、生防等多种作用的多效菌剂相比在市场上明显缺乏吸引力。在相当长的一段时期,研究者认为根瘤菌只有在结瘤共生状态下,才能固氮,发挥对作物的促生增产作用。但近年来随着对根瘤菌的深入了解,有人发现某些能够分解难溶性磷、能大量分泌生长素的菌株作为根际溶磷促生菌存在时,对非寄主植物也有良好的促生作用[27] [28]。尤其在缺磷地区,缺磷胁迫导致豆血红蛋白和相关的固氮酶类合成受抑、根瘤固氮能力也随之下降。磷素充足时固氮能力突出的菌株在面临缺磷胁迫时会形成无效根瘤,只消耗宿主光合产物而固氮量极低,使宿主生物量不增反降[27]。此时,根际存在的解磷根瘤菌能溶解土壤中的难溶性磷,提高根际的可溶性磷含量。能高产生生长素的菌株也会加速刺激根系及游离根瘤菌的生长[29],形成更多的根瘤,也提供更多的有效磷[30]。Zaied 等(2009)通过重组基因选育出能够大量分泌植物激素 IAA 的根瘤菌菌株,可促进作物的种子产量和蛋白含量,并有提高植株叶绿素含量的作用[31]。可见,具有解磷、产生生长素等多种促生能力的根瘤菌株比仅具备固氮能力的普通根瘤菌更有潜力。但问题在于,自然界中解磷根瘤菌尤其是解无机磷根瘤菌出现的概率较低,往往固氮能力强,且能溶解难溶性无机磷的菌株只占根瘤菌的 1%~0.2% [32] [33]。且这类菌株的解磷能力较其他的根际解磷菌分离出的菌株要弱[34]。李剑峰等利用微波辐照诱变,分别获得高效解磷的苜蓿根瘤菌和高效产生生长素的红豆草根瘤菌突变株,经宿主和非宿主植物的肥效验证,表明增效突变株的促生性能优良,遗传性状稳定[26] [35]。可见,利用菌种诱变育种对已有的多效根瘤菌菌种进行增效诱变,并选择其中的优良突变株作为工程菌是根瘤菌剂生产中较为经济而高效的手段。

7. 其他因素

除上述问题外,在根瘤菌剂的施用和生产方面也存在一些问题。如多数菌剂产品未针对不同耕作制度——如机械化和传统耕作形成具体的配套措施和施用方法。而在不同施用地区的化学氮肥施用量也对根瘤菌剂的施用效果有较大的影响,当化学氮肥含量过高时,高浓度的氮素会遏制根瘤的固氮作用,使

其空耗宿主的光合产物。此外，菌剂施用后的持续效应也长期被菌剂生产者 and 使用者所忽略，如菌种释放后去向及对土壤中的有益菌种的增殖和存活的影响目前也尚不明确。而对于真正有效的优良菌剂产品，也未形成有效而规范的知识产权保护。在这一现状下，一些优良菌剂在面试后很快被仿制，一些企业通过从其他优良菌剂产品中重新提取菌种进行生产，这样的产品菌种实际上已退化严重。这些问题同样对菌剂生产厂家和使用者的经济利益造成巨大损失，也使整个根瘤菌剂产业面临危机，陷入长期发展不前的僵局。

8. 结语

根瘤菌剂的菌剂质量由菌种促生能力、菌剂中的有效菌数和菌剂的污染率等主要指标决定。多年来，众多研究者和菌剂生产厂家为提高根瘤菌剂的产品质量和肥效做出了深入的研究和探讨，并推动了菌种选育技术和菌剂制备工艺上的发展。但至今，根瘤菌剂产品还存在污染率高、有效菌数低、菌种促生效果有限、施用配套技术和产品知识产权保护等方面的问题。因此，如何提高根瘤菌株的结瘤竞争能力，在菌种选育、菌剂生产、产品施用配套技术等方面做好菌剂产品的质量控制、售后技术支持及拓宽根瘤菌剂的应用范围将是进一步研究的重点。

基金项目

贵州省科技基金(黔 J[2014]2137)，贵州省重点支持学科建设项目(2011231)和贵州师范学院博士基金(13BS019)项目资助。

参考文献 (References)

- [1] 干大木, 赵小琴, 周义, 等 (2009) BGB 草莓专用微生物菌剂在草莓生产上的应用试验. *南方农业*, **4**, 8-9.
- [2] 师尚礼 (2005) 紫花苜蓿根瘤菌研究进展. *甘肃农业大学学报*, **2**, 262-267.
- [3] Rossi, M.J., Agenor, F.J. and Oliveira, V.L. (2007) Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technology and Biotechnology*, **45**, 277-286.
- [4] Kenney, D.S. (1997) Commercialization of biological control products in the chemical pesticide world. In: Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., et al., Eds., *Plant Growth—Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future Prospects*, Faculty of Agriculture, Sapporo University, Sapporo, 120-127.
- [5] Schwartz, M.W., Hoeksema, J.D., Gehring, C.A., et al. (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology Letters*, **9**, 501-515.
- [6] Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, **16**, 729-770.
- [7] Olsen, P.E., Rice, W.A. and Collins, M.M. (1994) Biological contaminants in North American legume inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 699-701.
- [8] Gomez, M., Silva, N., Hartmann, A., et al. (1997) Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 167-173.
- [9] Lupwayi, N.Z., Clayton, G.W. and Rice, W.A. (2006) Rhizobial inoculants for legume crops. *Journal of Crop Improvement*, **15**, 289-321.
- [10] Catroux, G., Hartmann, A. and Revellin, C. (2001) Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, **230**, 21-30.
- [11] Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M. and Temprano, F.J. (2008) Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 2771-2779.
- [12] 中华人民共和国农业部 (2001) 根瘤菌肥料标准 NY410-2000. 中国标准出版社, 北京, 1-9.
- [13] Paau, A.S. (1988) Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. *Trends in Biotechnology*, **6**, 276-279.
- [14] Jung, G., Mugnier, J., Diem, H.G. and Dommergues, Y.R. (1982) Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes. *Plant and Soil*, **65**, 219-231.

- [15] Marufu, L., Karanja, N. and Ryder, M. (1995) Legume inoculant production and use in East and Southern Africa. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 735-738.
- [16] Thompson, J.A. (1991) Australian quality control and standards. In: Thompson, J.A., Ed., *Report of the Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 107-111.
- [17] Lupwayi, N.Z., Olsen, P.E., Sande, E.S., Keyser, H.H., Collins, M.M., Singleton, P.W. and Rice, W.A. (2000) Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, **65**, 259-270.
- [18] Smith, R.S. (1992) Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**, 485-492.
- [19] Rossi, M.J., Agenor, F.J. and Oliveira, V.L. (2007) Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technology & Biotechnology*, **45**, 277-286.
- [20] 常玮, 王炜, 屈新兰 (2004) 苜蓿根瘤菌菌剂的研究. *新疆农业科学*, **2**, 102-104.
- [21] 张会春 (1999) 细菌肥料的研究与生产现状. *农业与技术*, **19**, 38-40.
- [22] 中华人民共和国农业部 (2009) 根瘤菌生产菌株质量评价技术规范. NY/T 1735-2009, 北京.
- [23] Kossiak, R.M. and Bohlool, B.B. (1985) Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1128-1133.
- [24] Sessitsch, A., Jjemba, P.K., Hardarson, G., Akkermans, A.D.L. and Wilson, K.J. (1998) Measurement of the competitive index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the gusA gene. *Soil Biology and Biochemistry*, **29**, 1099-1110.
- [25] Kumar, R. and Chandra, R. (2008) Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* Bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. *World Journal of Agricultural Sciences*, **4**, 297-301.
- [26] 李剑峰, 张淑卿, 师尚礼 (2009) 微波诱变选育高产生长素及耐药性根瘤菌株研究. *核农学报*, **6**, 981-985.
- [27] 李剑峰 (2011) 解磷根瘤菌诱变选育及抗污染菌剂制备关键技术研究. 甘肃农业大学, 兰州, 87-112.
- [28] Chaiarn, M. and Lumyong, S. (2011) Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current Microbiology*, **62**, 173-181.
- [29] Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao, S. and Minamisawa, K. (1994) The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant and Cell Physiology*, **35**, 1261-1265.
- [30] Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J.L., et al. (2008) Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and Soil*, **312**, 25-37.
- [31] Zaied, K.A., Kosba, Z.A., Nassef, M.A. and El-saied, A.I. (2009) Induction of *Rhizobium* inoculants harboring salicylic acid gene. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **3**, 1386-1411.
- [32] 师尚礼, 曹致中, 刘建荣 (2007) 苜蓿根瘤菌溶磷和分泌植物生长素能力研究. *草业学报*, **1**, 105-111.
- [33] 祁娟 (2006) 苜蓿种子根瘤菌筛选及其促生能力研究. 甘肃农业大学, 兰州.
- [34] Halder, A.K. and Chakrabarty, P.K. (1993) Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiologica*, **38**, 325-330.
- [35] 李剑峰, 张淑卿, 师尚礼, 霍平慧 (2009) 微波诱变选育耐药高效溶磷苜蓿根瘤菌. *原子能科学技术*, **12**, 1071-1076.