

盆栽条件下溶磷菌对花生生长的影响^①

王 同^{1,2}, 孔令雅¹, 焦加国¹, 刘满强¹, 胡 锋¹, 孙 波², 李辉信^{1*}

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 国家红壤改良工程技术研究中心, 中国科学院红壤生态站, 江西鹰潭 335211)

摘要: 利用本实验室在红壤茶园土中筛选出的高效溶磷菌 B1, 以红壤为基质进行花生盆栽试验, 研究溶磷菌 B1 对花生生长的影响。试验设置接种溶磷菌(B1, 苏云金芽孢杆菌)、直接添加草酸(OA)、磷酸二氢钾(KP)以及空白对照(CK)处理。结果表明溶磷菌在红壤中定殖能力强、存活性较好; 与对照相比, 接种溶磷菌能显著提高土壤有效磷含量, 促进花生根瘤的形成以及地下部生长发育, 增加根面积、根体积和根尖数, 花生果实的双英果比例提高 5%, 百仁重高出 3.8 g, 果实中粗蛋白的含量增加 2.5%。各项指标都显示, 接种溶磷菌的效果要显著好于直接添加草酸的效果, 而与直接添加可溶性磷源的效果相当。因此开发有效的溶磷菌剂应用于大田生产是可行的。

关键词: 土壤盆栽; 溶磷菌; 花生

中图分类号: S154.39; S154.4

磷不仅是植物细胞内各种重要物质的组成成分, 同时还是维持植物细胞稳定、遗传及对营养物质选择性吸收的必要物质, 磷还可以调节植物与外界物质、能量的交流^[1-2]。土壤供磷充足时, 能有效促进农作物的生长发育、产量构成及品质提高, 一旦缺乏, 将严重抑制作物发育, 降低作物种子的萌发率, 使得作物幼苗长势弱、易倒伏, 从而影响到作物产量^[3-4]。

近年较多研究表明, 土壤溶磷菌可通过改善植物根际微环境, 活化土壤中的难溶性磷, 从而改善植物磷营养状况^[5-7]。有关溶磷菌在室内或大田对植物生理效应的研究已有报道。易艳梅^[8]在研究中发现, 将一株产多糖溶磷菌接种至盐渍土中, 菌株能较好地定殖, 并促进难溶性磷的溶解以及多种营养素在小麦中的吸收, 提高小麦的干物质量, 具有缓解小麦盐胁迫的作用。秦超琦等^[9]发现, 在以盐土为基质的盆栽中混合施用 AM 菌剂和毛霉菌剂, 能显著促进蓖麻和海滨锦葵的生长, 并使得土壤有效磷含量较 CK 增加 53%~89%。Alvaro 等^[10]将溶磷菌分别接种至栽种鹰嘴豆和大麦的土壤中, 发现接菌处理的鹰嘴豆和大麦的干物质量分别增长了 17.5% 和 10%, 且接菌处理的植株体内磷含量要显著高于对照处理。

红壤是我国主要的土壤类型之一, 但红壤的黏、瘦、板和酸, 特别是红壤的磷素有效性较低等特点使其生产力受到极大的限制^[11-12]。目前有关溶磷菌在红壤上对作物生长发育的影响鲜见报道。本试验以我们从红壤中筛选出来的溶磷菌 B1 为试材, 盆栽条件下研究在红壤中接种溶磷菌对花生生长发育的影响, 为溶磷菌的大田应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤 供试土壤采自江西省进贤县连续种植了 3 年花生的旱地红壤, 母质为第四纪红黏土, 采样深度为 0~20 cm。采回的土壤经风干、粉碎后, 过 2 mm 筛待用。供试土壤的基本理化性质为 pH 5.32, 全氮 1.16 g/kg, 全磷 0.56 g/kg, 有机质 10.11 g/kg, 碱解氮 75.55 mg/kg, 速效钾 47.98 mg/kg, 速效磷 7.63 mg/kg。

1.1.2 供试花生品种 赣花 1 号。

1.1.3 供试菌株 供试菌株为本实验室筛选的红壤优势溶磷菌株苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) B1(能将难溶性磷酸盐转化为可溶性磷酸盐的菌株 B1, 专利号为 ZL 2011 1 0095783.2)。将生长在平板培养基上的菌株用接种环刮入无菌水中, 制成菌悬液。

* 基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BADC6B03)资助。

* 通讯作者(huixinli@njau.edu.cn)

作者简介: 王同(1985—), 女, 江苏盐城人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物生态的研究。E-mail: wtcu@163.com

($\times 10^8$ cfu/ml)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设置 花生种子经过消毒处理后浸种催芽。红壤风干后过 2 mm 筛，土壤湿度调节到 50% 的田间最大持水量，每个盆钵装土 8 kg，植入出芽的花生两颗。试验处理设为红壤(CK)、红壤+溶磷菌(B1)、红壤+草酸(OA)、红壤+磷酸二氢钾(KP)。每个处理 6 次重复(添加外源物质的处理仅在布置试验时添加一次，此后不再添加)。

B1 处理添加 80 ml 菌悬液(10 ml/kg 土)^[13]；OA 处理添加 80 ml 草酸溶液浓度为 5 g/L；KP 处理添加 80 ml 磷酸二氢钾溶液浓度为 2 g/L，CK 加入等量去离子水(在前期预实验中发现，B1 在原位土中培养能够显著提高土壤有效磷含量并伴随草酸的分泌，在原位培养 14 天后，土壤中草酸最高增量约为 50 mg/L，土壤有效磷的最高增量约为 20 mg/kg，以此作为本试验中草酸和磷酸二氢钾的添加依据)。所有盆钵均放在常温环境下培养至花生收获。培养期间称重补水，分别于 15、30、60、90、120 天进行破坏性采样分析土壤中的溶磷菌数、有效磷、pH；花生植株所测指标包括根瘤数量、根系形态分析；花生果实所测指标包括双荚果比例、产量以及粗蛋白含量。

1.2.2 测定方法 土壤有效磷测定方法：采用盐酸-氟化铵溶液浸提，浸提液用钼锑抗比色法测有效磷。土壤 pH 测定方法：水土比为 2.5:1，震荡 10 min，静置 10 min，用 pH 计测定^[14]。

土壤中溶磷菌的数量：采用 PVK 平板培养基计数法计算(PVK 培养基：磷酸铝 5 g，蔗糖 10 g，硫酸铵 0.5 g，氯化钠 0.1 g，七水合硫酸镁 0.1 g，氯化钾 0.2 g，硫酸锰 0.03 g，七水合硫酸亚铁 0.03 g，酵母菌膏 0.5 g，琼脂 15 g，水 1 000 ml，pH 7.0~7.2)^[15]。

花生根系形态分析：根系分析仪(WinRHIZO A1600+, Regent Instruments Inc)。花生果实粗蛋白含量的测定方法：消煮-凯式定氮法^[14]。

1.3 数据处理

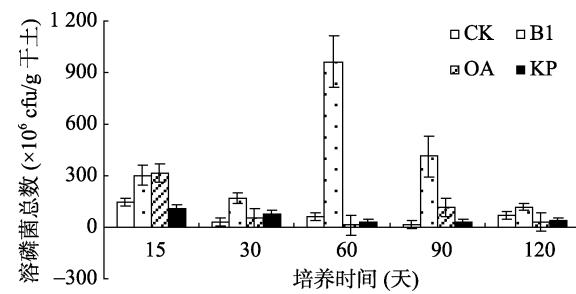
数据采用 Excel 和 SPSS 统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌在培养期间的存活状况

从图 1 可以看出，接种 B1 的处理其土壤中溶磷菌的总数始终都处于较高的水平，未接菌的处理，在花生生长期间土壤中溶磷菌的总数也能达到 10^7 cfu/g 土左右。接菌处理的土壤中溶磷菌的生长经历了一个波动的过程，其总的变化趋势是先减少后增加

再减少。在培养 15 天后，B1 和 OA 处理的土壤溶磷菌总数已显著高于其他处理，培养 30 天后这两个处理的溶磷菌总数出现显著下降。在培养 60 天后，接菌处理的溶磷菌总数最大能达到 9.6×10^8 cfu/g 土，而 OA 处理的溶磷菌总数最少，只有 1.3×10^7 cfu/g 土，二者相差 90 倍左右。随着培养时间的延长，B1 处理的溶磷菌总数显著下降，但仍显著高于其他处理。在培养结束的时候，各处理间土壤溶磷菌的总数没有显著差异。KP 处理土壤中溶磷菌的总数在整个培养过程中都比较低，甚至还会低于对照处理。



(误差线以标准误表示($n = 6$)，下图同)

图 1 土壤中溶磷菌总数

Fig. 1 Population of phosphorus solubilized microbe in soil

2.2 接种菌株对土壤 pH 和有效磷的影响

从图 2 可以看出各处理间土壤 pH 的变化趋势都呈现一致性，总体趋势为先下降后升高，而除对照外其余处理的土壤有效磷含量的变化趋势均呈缓慢上升。在培养的前 30 天内，各处理土壤 pH 之间均没有显著差异。而各处理间土壤有效磷含量均要低于原始土壤的有效磷含量水平，KP 处理的土壤有效磷含量在整个培养期间均显著高于其他处理(图 3)。在培养 60 天后，B1 处理的 pH 下降至最低值 4.67，显著低于其他 3 个处理，其土壤有效磷含量只显著高于 CK 和 OA 处理，OA 和 KP 这两个处理的土壤 pH 显著低于对照，却又显著高于接菌处理，且这两个处理间在培养结束前都没有显著差异。在培养 90 天后，KP 处理的土壤中有效磷含量高达 11.23 mg/kg，B1 处理的有效磷含量为 8.16 mg/kg，而空白对照的土壤有效磷含量只有 3.59 mg/kg，添加 KP 可使土壤中有效磷含量增加 8.64 mg/kg，单纯接种 B1 的处理，其有效磷含量比对照增加了 4.57 mg/kg。在培养结束时，对照土壤 pH 上升得最快，并显著高于其他处理。OA 和 CK 处理的土壤有效磷含量要显著低于 B1 和 KP 处理。其中所有处理的土壤有效磷含量与培养初期相比都有大幅度提高，B1 和 KP 处理的土壤有效磷含量跟培养初期相比分别提高了 6.88 mg/kg 和 6.24 mg/kg。

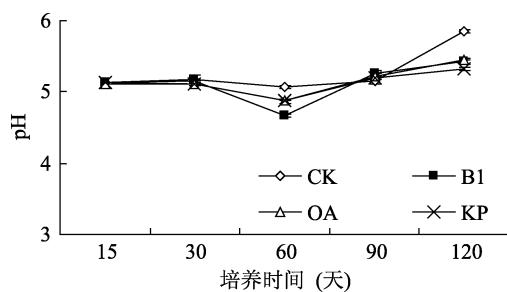
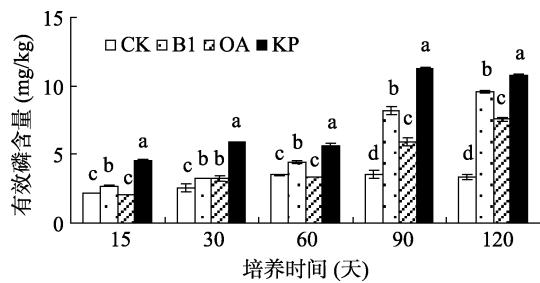


图 2 接种菌株对土壤 pH 的影响

Fig. 2 Effects of inoculating microbe on soil pH during incubation



(图中小写字母不同表示同一培养时间内处理间差异达显著水平 ($P < 0.05$) , 下同)

图 3 接种菌株对土壤有效磷的影响

Fig. 3 Effects of inoculating microbe on soil available P during incubation

2.3 接种菌株对花生根瘤以及根系生长的影响

培养 15 天后花生生长仍处于苗期，地下部还没有发现根瘤生长。在培养的前 60 天，与对照相比其余 3 个处理的花生根瘤数量均有显著增加。从图 4 可以看出，接种 B1 的处理其花生的根瘤数量在整个培养过程中均显著高于其他各处理，这可能是因为 B1 的加入，对根瘤菌的侵染结瘤和生长发育有促进作用。在培养后期，除 B1 处理外其余 3 个处理之间均没有显著差异。

可以看出，接种 B1 的处理其花生的根瘤数量在整个培养过程中均显著高于其他各处理，这可能是因为 B1 的加入，对根瘤菌的侵染结瘤和生长发育有促进作用。在培养后期，除 B1 处理外其余 3 个处理之间均没有显著差异。

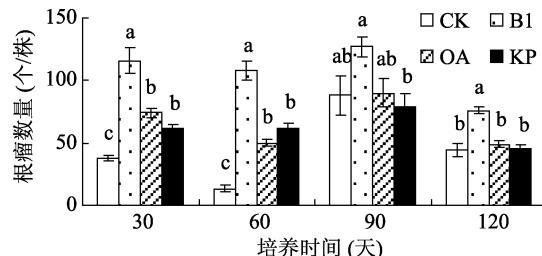


图 4 接种菌株对花生根瘤数量的影响

Fig. 4 Effects of inoculating microbe on number of peanut root nodules during incubation

由图 5 可以看出，各处理间花生根系的生长在培养 60 天的时候达到高峰，之后随着花生的下针结荚而出现萎缩甚至腐烂。各处理的花生根长在培养期间没有显著差异；B1 和 KP 处理在培养期间能够显著增加花生植株的根尖数、根表面积以及根体积，在培养后期，各处理之间差异不显著。

2.4 接种菌株对花生产量及品质的影响

根据图 6 的试验结果可以看出，接种 B1 能显著提高花生果实的百仁重，B1 处理的百仁重分别比空白对照、OA 和 KP 处理高出了 3.6、8.3 和 4.3 g，增

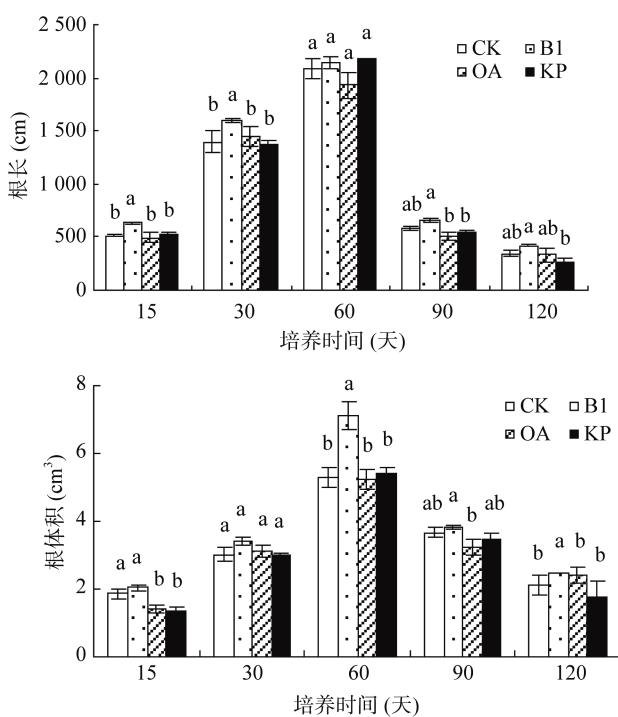
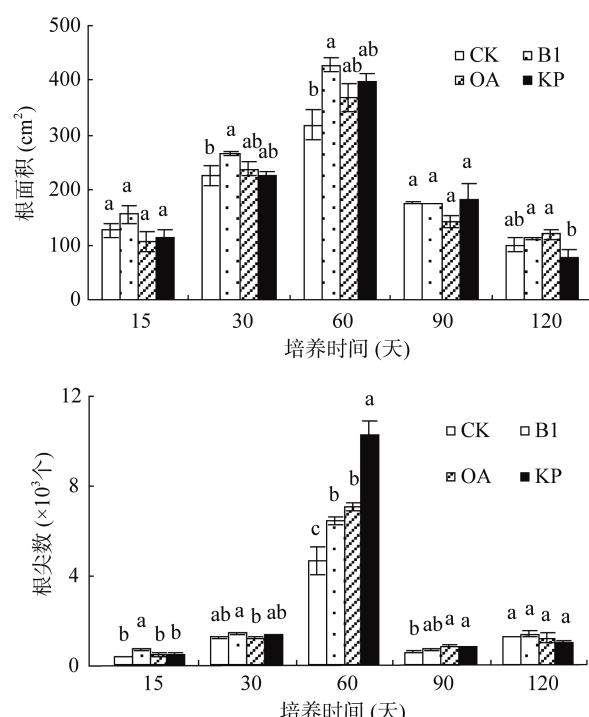


图 5 接种菌株对花生根系形态的影响

Fig. 5 Effects of inoculating microbe on root's morphology during incubation



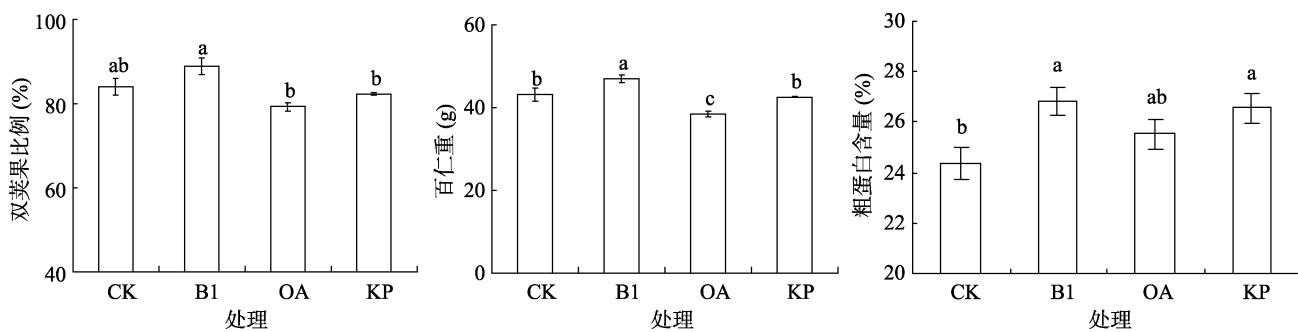


图 6 接种菌株对花生产量及品质的影响

Fig. 6 Effects of inoculating microbe on yield and quality of peanut during incubation

幅分别达到 8%、22% 和 10.1%。B1 处理的花生双英果比例要显著高于 OA 和 KP 处理，与对照相比差异不显著。根据对果实中粗蛋白含量的测定，添加外源物质的处理其花生果实粗蛋白含量均高于空白对照，其中 B1 和 KP 处理的值与对照相比差异达到显著水平，但 OA 处理与对照之间没有显著差异。接种 B1 的处理其粗蛋白含量跟对照比要高出约 2.5%。该结果显示，接种溶磷菌可以提高花生产量及品质。

3 讨论

溶磷微生物接种进入土壤后的生长繁殖和对难溶性磷的活化是一个相当复杂的过程，这会受到土壤中很多因素的制约。Paul 和 Sundara^[16]研究发现作物种类对溶磷菌的生存有显著作用；Asea 等^[17]在石灰性土壤中研究了 2 株溶磷菌的生长状况，发现溶磷菌的生长与土壤 pH 下降直接相关；易艳梅^[18]研究发现在被重金属污染的土壤中，重金属胁迫条件下，溶磷菌的生存会受到极大影响。本研究利用改良后的溶磷菌专性培养基即 PVK 培养基计算出土壤中的溶磷菌总数。从数据的变化来看，接种 B1 的土壤中溶磷菌的总数显著高于其他处理，产生这一现象的原因可能有：B1 在土壤中定殖能力较好，经历了旺盛的生长过程，而后可能由于营养的缺乏导致其数量又大幅度减少；由于 B1 的参与，土壤中的土著溶磷微生物在 B1 的刺激下旺盛生长，而后由于竞争使得营养缺乏，数量出现直线下降。

本试验结果显示接菌处理的土壤 pH 与土壤中溶磷菌总数的变化呈现出极显著负相关关系($R^2 = 0.8172$)，很多研究表明，溶磷菌在溶磷过程中会分泌大量有机酸，导致培养介质的 pH 下降^[18-20]，从培养第 60 天的土壤 pH 可以看出，接种菌株的处理土壤 pH 显著低于其他处理，而此时接菌处理土壤中的溶磷菌总数最大，显著高于其他处理，导致 pH 下降的原因可能是除了溶磷菌 B1 自身分泌的有机酸外，它还能刺激

花生根系增强有机酸的分泌，共同协同进行溶磷作用。我们同时也要考虑到，外加的有机酸直接添加到土壤中，有可能会被土壤直接吸附固定或逐渐被微生物分解，所以作用不显著^[21]。对照中的有效磷也较种植花生前有所增加，可能原因有：原土中也存在一定数量的溶磷菌，它们对土壤有效磷的升高作出了贡献；花生根系在土壤中生长，补充的水分、根系分泌物等都能够刺激微生物的繁殖，使土壤中的有效磷得到活化^[7, 22]。从土壤有效磷的变化趋势来看，在红壤中接种溶磷细菌 B1 可以显著提高土壤有效磷含量。在培养后期，由于微生物死亡，土壤溶磷菌数量下降，土壤 pH 升高，溶磷菌所积累的微生物生物量磷转化为无机磷，从而导致土壤有效磷含量的增加^[23]。外加的可溶性磷源，花生植株可以直接吸收利用，减少了土壤的吸附固定作用，而外加的溶磷菌悬液和草酸溶液则需要经过一个转化难溶性磷酸盐的过程，才能慢慢地向花生提供可直接吸收利用的磷源。根据花生产量和品质的数据可以看出，接种溶磷菌的效果要好于添加草酸和磷酸二氢钾。接种溶磷菌株 B1 能够增加花生果实的双英果比率，且与 OA 和 KP 处理之间差异达到显著水平。接种 B1 能提高花生产量和品质的作用机理可能包括：改善作物营养；与根瘤菌的协同作用^[24-25]。但是，花生产量的衡量和品质的鉴定包含了很多指标^[25]，本试验只是选取了其中 3 个指标，只能粗看溶磷菌接种后的效果，还需经过大田试验来进一步验证接种溶磷菌能提高花生的产量和品质这一结论。

本试验结果发现，溶磷菌 B1 与土著根瘤菌之间有一定的协同促进作用，可对于这一现象的机理目前报道得较少^[26-27]。但是这也表明，在研制微生物肥料时，摸清楚这些微生物之间的相互作用，有目的地将几种有益微生物进行混合培养，产生的效果很有可能优于单株菌培养的效果，这对开发利用微生物肥具有很重要的指导作用。从整个试验中各处理的结果来

看，处理效果是 KP>B1>OA>CK。各项指标都显示接种溶磷菌的效果要显著好于直接添加草酸的效果，而与直接添加可溶性磷源的效果相当。因此开发有效的溶磷菌剂应用于大田生产是可行的。

4 小结

溶磷菌 B1 接种进土壤后，自身生长较好，并且能刺激土壤中土著溶磷菌的生长。B1 在接种进土壤后能促进土著根瘤菌的生长，显著增加花生根瘤数，增强花生的固氮能力。B1 能促进花生根系发育，增加花生果实的百仁重、双荚果比率以及粗蛋白含量。

参考文献：

- [1] Raghothama KG. Phosphate acquisition[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 665–693
- [2] Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource[J]. New Phytologist, 2003, 157(3): 423–447
- [3] 严小龙, 张福锁. 植物营养遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 8–197
- [4] 吴平, 印莉平, 张立平. 植物营养分子生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 200–205
- [5] 郝晶, 洪坚平, 刘冰, 张健. 石灰性土壤中高效解磷细菌株的分离、筛选及组合[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 404–408
- [6] 洪坚平, 郝晶, 毕理智, 谢英荷, 刘冰. 不同解磷菌群对油菜土壤养分与酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(5): 51–54
- [7] 牛廷香, 邓烈, 易时来, 简仙水, 赵旭阳, 王亮, 何绍兰. 溶磷菌对柑桔嫁接苗磷素营养及生长发育的影响[J]. 中国南方果树, 2011, 40(3): 11–14
- [8] 易艳梅. 细菌溶磷作用及其对磷矿粉重金属释放和小麦盐胁迫的缓解 (博士学位论文)[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [9] 秦超琦, 吴向华, 郑琨, 钱佩. 解磷菌剂对海滨盐土有效磷含量及耐盐油料植物生长的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(9): 1835–1841
- [10] Alvaro P, Elke L, Susanne V, Cathrin S, Rau IR, Ignacio SR, Pedro FM, Eustoquio MM, Claudino RB, Encarna V. *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(5): 334–341
- [11] 王艳玲, 何园球, 吴洪生, 李仁英, 金飞. 长期施肥下红壤磷素积累的环境风险分析[J]. 土壤学报, 2010, 47(5): 880–887
- [12] 刘文干, 何园球, 张坤, 樊建波, 曹慧. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 326–333
- [13] 程淑琴. 两株溶磷菌在两种土壤中的溶磷作用 (硕士学位论文)[D]. 北京: 中国农业大学, 2003
- [14] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [15] Gupta R, Singal R, Shankar A. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1994, 40(3): 255–260
- [16] Paul NB, Sundara Rao WVB. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes[J]. Plant and Soil, 1971, 35: 127–132
- [17] Asea PE, Kucey RN, Stewart JB. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1988, 20(4): 459–464
- [18] Elizabeth P, Miguel S, Maria M, Yarzabal LA. Isolation and characterization of mineral phosphate solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2905–2914
- [19] Ben Farhat M, Farhat A, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, Antoun H, Bejar S, Chouayekh H. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa[J]. Archives of Microbiology, 2009, 191(11): 815–824
- [20] Lu LL, Shu YQ. Effect of different carbon sources on phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines[A]//International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring[C]. Changsha, 2011: 1124–1127
- [21] 龚松贵, 王兴祥, 张桃林, 李清曼, 周静. 低分子量有机酸对红壤无机磷活化的作用[J]. 土壤学报, 2010, 47(4): 692–697
- [22] 朱培森. 高效解磷细菌的筛选及其应用 (硕士学位论文)[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [23] 黄伟. 红壤中溶磷菌的筛选及溶磷特性的研究 (硕士学位论文)[D]. 南京: 南京农业大学, 2006
- [24] 李剑峰, 师尚礼, 张淑卿. 解磷微生物肥料研究进展[J]. 草业与畜牧, 2010, 23(7): 1–5
- [25] 苏秋芹. 不同株型花生品质性状与主要数量性状的相关分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 192–194
- [26] Susana BR, Javier AA, Marisa R, Nestor SC. Phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 3502–3505
- [27] 胡晓蕊, 韩梅, 韩晓日. 土壤解磷微生物混合培养条件的优化[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(1): 45–49

Effects of Phosphate-solubilizing Bacteria B1 (*Bacillus thuringiensis*) on Peanuts in Pot Experiment

WANG Tong^{1,2}, KONG Ling-ya¹, JIAO Jia-guo¹, LIU Man-qiang¹, HU Feng¹, SUN Bo², LI Hui-xin^{1*}

(1 College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 National Engineering Research and Technology Center for Red Soil Improvement, Red Soil Ecological Experiment Station, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

Abstract: With *Bacillus thuringiensis* B1 from the red soil as phosphate-solubilizing bacteria (PSB), a pot experiment was conducted to study its effects on the available phosphorous (P) content of the red soil and the growth of peanuts. Four treatments were designed as follow: CK——control; B1——with B1 added; OA——with oxalic acid added; KP——with KH_2PO_4 added. The results showed that the population of PSB increased significantly in B1 treatment, soil available P, the number of peanuts nodules were increased in B1 treatment compared to control. Inoculation of B1 could promote the growing development of peanut root system. The plant hundred-nutlet weight, the ratio of double pods, the crude protein content of peanut fruit increased 3.8 g, 5% and 2.5% in B1 compared to control. The PSB B1 showed great potential as superior isolate for high efficient biological phosphorus fertilizer.

Key words: Pot experiment, Phosphate-solubilizing bacteria, Peanuts