

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.01.009

魏志敏, 孙斌, 方成, 等. 固氮芽孢杆菌 N3 的筛选鉴定及其对二月兰的促生效果. 土壤, 2021, 53(1): 64–71.

固氮芽孢杆菌 N3 的筛选鉴定及其对二月兰的促生效果^①

魏志敏, 孙斌, 方成, 代子雯, 刘满强, 焦加国, 胡锋, 李辉信, 徐莉*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 从山东泰安农田土壤中筛选获得 1 株固氮能力强的菌株 N3, 通过形态观察、生理生化特征以及 16S rDNA 基因序列分析, 确定为巨大芽孢杆菌属(*Bacillus megaterium*), 该菌株固氮酶活性达 C_2H_4 28.33 nmol/(h·ml)。温室条件下进行二月兰盆栽试验, 设置不接种对照(CK)、接种巨大芽孢杆菌 N3、接种产吲哚乙酸(IAA)菌 CDL29 和复合接种菌株 N3+CDL29 四个处理, 探讨了接种不同植物促生菌对二月兰的促生效果。结果表明: 接种植物促生菌均促进二月兰的生长, 且单一接种固氮菌株 N3 的促生效果最好, 其显著提高二月兰地上部氮、磷和地下部氮、钾的含量, 相对对照, 增幅分别为 33.03%、55.56% 和 29.87%、51.11%, 其他处理也有提高二月兰养分含量的趋势, 但并不显著; 单一接种菌株 N3, 土壤有机质、全氮和速效养分含量显著提高; 接种植物促生菌均提高土壤微生物生物量碳(MBC)和氮(MBN)的含量, 单一接种固氮菌株 N3 提升效果最佳, 接种产 IAA 菌株 CDL29 和复合接种次之。此外, 接种固氮菌株 N3 能够显著提升土壤固氮酶活性, 接种菌株 CDL29 对土壤固氮酶活性没有显著影响。因此, 单一接种固氮菌株 N3 在促进二月兰生长、养分含量提高及土壤理化和生物学性质改良上都具有显著的效果。

关键词: 植物促生菌; 固氮; 吲哚乙酸(IAA); 二月兰

中图分类号: S154.1 **文献标志码:** A

Isolation and Characterization of *Bacillus* Nitrogen-Fixing Bacteria and Its Growth-Promotion on *Orychophragmus violaceus*

WEI Zhimin, SUN Bin, FANG Cheng, DAI Ziwen, LIU Manqiang, JIAO Jianguo, HU Feng, LI Huixin, XU Li*
(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A strain N3 with strong nitrogen fixation ability was selected from the farmland soil in Taian, Shandong Province and was identified as *Bacillus megaterium* based on the morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequences analysis. Its nitrogenase activity was up to C_2H_4 28.33 nmol/(h·ml). Four treatments were set to explore the inoculation effect of different plant growth-promoting bacterium on the growth of *Orychophragmus violaceus*, including single or double inoculation of strain N3 or IAA (indole-3-acetic acid)-producing stain *Pantoea agglomerans* CDL29, plant without any inoculation set as the control treatment (CK). The pot experiment of *Orychophragmus violaceus* was conducted under greenhouse conditions. The results showed that all plant growth-promoting bacteria promoted the growth of *Orychophragmus violaceus*, and the treatment with single inoculation of nitrogen-fixing strain N3 was the best. At the same time, nitrogen and phosphorus contents in the shoots of *Orychophragmus violaceus*, nitrogen and potassium contents in the roots of *Orychophragmus violaceus* were significantly increased by the single inoculation of nitrogen-fixing strain N3, which were increased by 33.03%, 55.56% and 29.87%, 51.11% respectively compared with CK. Other treatments also promoted nutrient contents in *Orychophragmus violaceus*, but the trends were not statistic significant. The contents of soil organic matter, total nitrogen and available nutrients were significantly increased by single inoculation of nitrogen-fixing strain N3. The contents of soil microbial carbon(MBC) and microbial nitrogen(MBN) were increased by the inoculation of different plant probiotics, single inoculation of nitrogen-fixing strain N3 had the best effect, followed by the single inoculation of IAA-producing stain CDL29 and compound inoculation. In addition, inoculation of nitrogen-fixing strain N3 significantly increased soil nitrogenase activity, while inoculation of CDL29 had

①基金项目: 国家绿肥产业技术体系项目(CARS-22-G-10)、公益性行业(农业)科研专项经费(201503121)和江苏省优势学科项目资助。

* 通讯作者(xuli602@njau.edu.cn)

作者简介: 魏志敏(1994—), 男, 江西南昌人, 硕士研究生, 主要从事植物促生菌的筛选及其对绿肥的促生研究。E-mail: 2017103026@njau.edu.cn

no significant effect on soil nitrogenase activity. As a conclusion, the single inoculation of nitrogen-fixing strain N3 could significantly promote the growth, nutrient contents in *Orychophragmus violaceus*, and also improve the physicochemical and biological properties of the soil.

Key words: Plant growth-promoting bacterium; Nitrogen fixation; IAA; *Orychophragmus violaceus*

二月兰(*Orychophragmus violaceus*)是十字花科植物,具有观赏和绿化的价值,是北方地区不可多得的早春观花、冬季观绿的地被植物。它还是一种实用性冬绿肥^[1],盛花期含有丰富的氮、磷、钾等矿质元素,翻压可以提高土壤有机碳含量,促进土壤微生物的活性,有利于保持土壤肥力^[2-3],还能提高主作物的产量和品质^[4]。绿肥生物量是发挥其地面覆盖、土壤残留氮素截获、土壤固碳和养分循环等农田生态服务功能的重要基础。研究表明施用氮肥可以显著提高二月兰的鲜草产量、养分积累量和籽粒产量^[5-6]。但现在大部分氮的施入是通过施加化肥,对土壤、作物和环境都会带来一系列的危害^[7]。有研究表明通过接种植物促生菌(PGPB)可以提高植株生物量^[8-10]和养分含量^[11],并对土壤有一定的改良作用^[12]。植物促生菌是在一定条件下有利于植物生长的自由生活在土壤、根际、根表、叶际的细菌^[13]。它们的促生机制包括固氮、解磷、产生植物激素等^[14-15]。

土壤供氮能力是绿肥作物生长的重要限制因子,特别对于非豆科绿肥作物,其生长所需氮素主要来源于土壤残留无机氮和土壤矿化氮,因此提高土壤氮水平很重要。土壤中有一些固氮微生物可以通过生命活动,将空气中游离态的氮素直接转变为含氮化合物,除供自身生长发育外,部分以无机状态或简单的有机氮化物分泌于体外,供植物吸收利用^[16]。由于植物能够调控土壤周围有益微生物的数量和活性^[17],植物根际土壤中微生物具有更多功能多样性,因此,可从根际土壤中分离和选育功能各异的有益微生物^[18-19],比较不同功能微生物或者混合培养物对植物生长的促进效应。

目前植物促生菌接种绿肥作物的报道较少,不同功能微生物的复合接种更少,而且除生物量外,绿肥养分含量及对土壤性质的影响很少被关注。因此,本文尝试从根际土壤中分离筛选高效固氮菌,结合实验室保存的产吲哚乙酸(IAA)菌株,在温室盆栽条件下研究单一和复合接种植物促生菌对绿肥作物——二月兰的促生效果,以及对其养分含量和土壤性质改良方面的影响,以为绿肥作物二月兰专用菌剂的生产和应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土壤样品来源及前期处理 采自山东泰安综合试验站(117°0'27" E, 35°59'55" N)种植花生的 0~20 cm 土样,土壤类型为棕壤褐土。挑除新鲜土样中的根系、蚯蚓、小石块等,土壤经风干、粉碎、过 2 mm 筛,备用。土壤有机质、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、全氮含量和 pH 分别为 25.77 g/kg、1.84 mg/kg、5.84 mg/kg、1.4 g/kg 和 7.19。

1.1.2 培养基 LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g, pH 7.0~7.2。Ashby 无氮培养基:葡萄糖 10 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCO₃ 5 g, CaSO₄·2H₂O 0.1 g, pH 6.8~7.0。无机盐培养基:(NH₄)₂SO₄ 2 g, NaH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, pH 7.0~7.2。各培养基配置时均用蒸馏水定容至 1 000 ml, 121℃ 灭菌 20 min, 固体培养基在此配方基础上加 18 g 琼脂。

1.1.3 供试菌株 为比较筛选菌株的固氮能力和产 IAA 能力,选择本实验室已筛选获得的成团泛菌 CDL29^[20](*Pantoea agglomerans*)、附着剑菌 R^[21](*Ensifer adhaerens*)以及购自中国农业微生物菌种保藏管理中心的固氮微生物圆褐固氮菌 YH^[22](*Azotobacter chroococcum*, 菌株编号为 ACCC10006)、巴西固氮螺菌 B^[23](*Azospirillum brasilense*, 菌株编号为 ACCC10104)进行对比。

1.2 固氮菌的筛选及功能测定

称取 10 g 土样,将其置于装有适量玻璃珠和 90 ml 无菌水的 250 ml 三角瓶中, 30℃、180 r/min 振荡 20 min,静置 10 min,得到土壤悬浮液。采用梯度稀释法稀释至 10⁻⁶后,吸取 0.1 ml 涂布在 Ashby 固体培养基上,平板置于 30℃ 恒温箱中倒置培养 24 h 后,将不同类型典型单个菌落挑出,经平板多次纯化后,4℃ 保存在 Ashby 固体培养基斜面待用。

固氮酶活性的测定:采用乙炔还原法^[24]。将筛选的固氮菌及对比菌株分别接入 LB 液体培养基中,培养 24 h 后用离心法收集菌细胞;再用无氮液体培养基重悬菌体,制成 10⁸ CFU/ml 的固氮菌悬液,作

为待接种菌液；接种制好的固氮菌悬液于装有 2 ml 无氮液体培养基的青霉素小瓶中，30℃培养 24 h；用密封性好的注射器先从培养有菌的青霉素小瓶抽取 1 ml 空气，再注入 1 ml 乙炔，用胶布密封针眼；继续培养 24 h，取 100 μl 气样在气相色谱仪上测定乙烯峰值。

采用 Agilent 7890A 气相色谱仪进行测定，其工作条件设置为：前进样口温度 200℃，前检测器(FID)温度 250℃，分离比 5:1，载体流速 1 ml/min，氢气流速 30 ml/min，空气流速 300 ml/min，尾吹气(氮气)流速 26 ml/min；柱温为梯度升温：32℃保持 1 min，32~70℃升温速度为 30℃/min，70℃保持 5 min，70~160℃升温速度为 10℃/min，160℃保持 15 min。乙炔还原活性计算公式为：乙炔还原活性 ARA(C₂H₄, nmol/(h·ml))=(实际 C₂H₄ × 峰面积标注气含量 × 青霉素瓶容积)/(标准气峰面积 × 进样量 × 培养时间 × 样品量)。

产 IAA 功能测定：将分离纯化后的细菌及对比菌株，接种于含有 L-色氨酸(100 mg/L)的 LB 液体培养基中，180 r/min、30℃条件下摇床培养 1 d。吸取 2 ml 菌液于离心管，10 000 r/min 离心 10 min，取 1.5 ml 上清液并加入等体积 Salkowski 比色液(50 ml 35% HClO₄ + 1 ml 0.5 mol/L FeCl₃)于 5 ml 离心管中，避光静置 30 min，测定其 OD₅₃₀ 值。对照标准曲线计算单位体积发酵液中 IAA 的含量。标准曲线的绘制采用分析纯的 IAA 梯度稀释制备。

1.3 N3 菌株的生理生化及 16S rDNA 序列分析

1.3.1 形态及生理生化特征测定 接种固氮菌 N3 于 Ashby 固体培养基平板上，观察菌落、菌体形态^[25]。参考《常见细菌系统鉴定手册》和《微生物学实验》测定相关生理生化特征^[26]。

1.3.2 16S rDNA 测序与系统学分析 常规方法培养菌株，SDS-CTAB 法提取细菌基因组总 DNA，作为扩增模板，采用 16S rDNA 通用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r(5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增，扩增片段长度为 1.5 kb。PCR 反应条件：94℃预变性 5 min，进入热循环，94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 10 min，共 30 个循环。DNA 测序由南京思普金生物科技有限公司完成，再将所得序列在 NCBI 进行比对，使用 MEGA 5.1 软件以 NJ 法建立系统发育树。

1.4 二月兰温室促生试验

1.4.1 试验设计 将筛选出的固氮能力强的菌株

N3 和产 IAA 能力强的菌株 CDL29 分别接种于 LB 液体培养基，30℃、180 r/min 摇床培养 24 h 后，在无菌条件下将菌液倒入已灭菌的离心管中，8 000 r/min 离心 5 min，去掉上清液，再用无菌水重悬菌体，制成菌悬液。

取山东泰安种植花生的土壤 3 kg 装盆，每盆种植 15 颗二月兰，二月兰种子首先用 3% 双氧水进行表面消毒 20 min，再用无菌水冲洗。菌液接种量按 10⁸ CFU/g 土接入，复合处理中两菌株比例为 1:1，对照为接种等量无菌水，每个处理设 4 个重复，控制含水量至田间最大持水量的 80%。种植 4 个月后，每盆采集长势一致的二月兰 3 株测定生物量、养分含量和根系形态及活力指标，同时采集土壤样品，测定土壤养分含量、微生物生物量碳和氮(MBC、MBN)含量及固氮酶活性。

1.4.2 指标测定 植株根系指标测定：根系扫描仪(LA1600+scanner, Canada)扫描二月兰根系形态，获取根系图像(Winrhizo2003b, Canada)进行相关根系指标分析。二月兰根系活力测定采用 TTC 法。

植株养分含量测定：H₂SO₄-H₂O₂ 消煮法，植株氮含量采用凯氏定氮法，磷含量采用钼蓝比色法，钾含量采用火焰光度计法。

土壤理化和生物学性质测定：pH 采用无 CO₂ 水浸提 pH 计法(土水质量比 1:2.5)测定；有机质含量采用重铬酸钾容量法测定；全氮含量采用半微量开氏法测定；全磷含量采用 HClO₄-H₂SO₄ 法测定；有效磷含量采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 法测定；速效钾含量采用 NH₄OAc 浸提，火焰光度计法测定；土壤 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 采用 2 mol/L KCl 溶液浸提，流动分析仪(SEAL Auto Analyzer3, 德国)测定；土壤 MBC、MBN 采用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法，K₂CrO₇ 外加热法测定 MBC 含量，半微量凯氏定氮法测定 MBN 含量。

土壤固氮酶活性测定：采用乙炔还原法，取盆栽土样 15 g 于 100 ml 血清瓶中，加入 0.1 mol/L 葡萄糖液 2 ml，摇匀，塞上异丁基胶塞，加铝盖密封。用注射器从瓶中抽出 5 ml 空气再注入等体积乙炔气体，密封针眼，28℃培养 2 d。培养结束后，取 500 μl 气样在气相色谱仪上测定乙烯峰值(测定仪器和参数设置与菌株固氮酶活性测定一致)。乙炔还原活性计算公式为：

$$\text{乙炔还原活性 ARA(C}_2\text{H}_4, \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})) = K \times \frac{T+x}{T} \times \frac{y}{760} \times \frac{z}{22.4 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{m} \times \frac{1}{t}$$

式中：k 为乙烯峰高/乙炔峰高；T 为绝对温度；x

为测定时的气温； y 为测定时的大气压；760 为标准大气压(汞柱)； z 为注入乙炔的量(ml)；22.4 为 1 g 分子气体在绝对温度和标准大气压下的体积； m 为测定样品的干重(g)， t 为注入乙炔后的反应时间(h)。

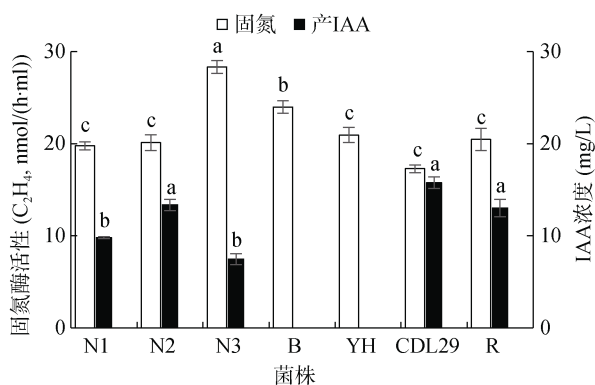
1.5 数据处理

利用 Microsoft Excel 2007 软件处理数据，并运用 SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析，对其显著性差异($P < 0.05$)用 LSD 和 Duncan's 检验法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 固氮菌的筛选及功能测定

本研究从供试土壤中分离得到 3 株具有固氮能力的菌株，分别命名为 N1、N2、N3。对菌株固氮酶活性和产 IAA 能力进行测定，结果如图 1 所示，菌株 N3 固氮能力最强，固氮酶活性达 C_2H_4 28.33 nmol/(h·ml)，与其他菌株间差异达到显著水平。菌株成团泛菌(CDL29)产 IAA 能力最强，培养 24 h 时 IAA 产生量达 15.76 mg/L。



(图中不同小写字母表示不同菌株固氮酶活性或产 IAA 能力差异显著($P < 0.05$))

图 1 菌株的固氮酶活性和产 IAA 能力比较

Fig. 1 Comparison of nitrogenase activities and IAA production capacities of different strains

2.2 固氮菌 N3 的鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征测定 筛选出的固氮菌株 N3，如图 2 所示，在无氮培养基上形成的菌落较小，为白色隆起，边缘整齐，表面光滑湿润，不透明，不规则杆状排列。该菌生理生化特性是：革兰氏阳性，兼性好氧，化能异氧，接触酶阳性，VP 试验阴性，淀粉水解阳性，明胶水解阳性，硝酸盐还原阴性。

2.2.2 16S rDNA 序列分析及菌种初步鉴定 经 16S rDNA 序列分析和 NCBI 数据库在线比对，结果

显示，N3 与 *Bacillus megaterium* 的同源性达 100%，序列登录号为 MK391574。用 MEGA 5.1 软件以 NJ 法建立系统发育树(图 3)，N3 与 *Bacillus megaterium* (MF187637.1)同源性最高，结合形态以及生理生化特征鉴定菌株 N3 为巨大芽孢杆菌属(*Bacillus megaterium*)。



图 2 菌株 N3 的菌落形态特征
Fig. 2 Colony morphology of strain N3

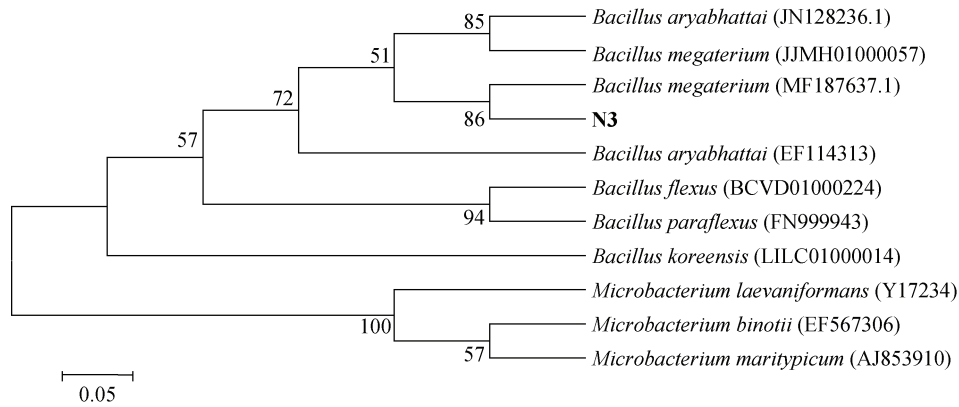
2.3 植物促生菌接种二月兰温室促生试验

2.3.1 接种植物促生菌对二月兰生长的影响 由表 1 可知，与 CK 相比，各接种植物促生菌处理二月兰地上部和地下部鲜重、株高和茎粗都增加，表明接种植物促生菌能促进二月兰的生长。接种菌株 N3 处理二月兰地上部和地下部鲜重、株高和茎粗显著增加且数值最大，说明接种固氮菌株 N3 处理对二月兰的促生效果好于接种产 IAA 菌株 CDL29 处理和复合菌株接种处理。

二月兰接种植物促生菌后，根系生长发育指标：根系总长、表面积、体积以及根尖数都有显著性提高，特别是 N3 处理，接种固氮菌株 N3 后二月兰根系总长、表面积、体积、根尖数较 CK 分别提高 1.27 倍、1.28 倍、1.48 倍、1.11 倍(表 1)。

此外，接种植物促生菌能显著提高二月兰根系活力，其中以接种固氮菌株 N3 处理最高，达 0.16 mg/(g·h)，但接种菌株 CDL29 处理和复合接种 N3+CDL29 处理间没有显著差异(图 4)。

由表 2 可知，与 CK 相比，各接种植物促生菌处理二月兰植株地上和地下部氮、磷、钾养分含量有所增加，表明接种植物促生菌对二月兰植株的养分含量有一定的积累作用。单一接种固氮菌株 N3 处理能显著提高二月兰地上部氮、磷和地下部氮、钾的含量，相比 CK，增幅分别为 33.03%、55.56% 和 29.87%、51.11%。单一接种产 IAA 菌株 CDL29 处理以及复合接种处理也有促进二月兰养分含量的趋势，但并不显著。



(标尺代表每 100 个核苷酸中有 5 个核苷酸替代)

图 3 基于菌株 N3 和相关菌株的 16S rDNA 序列采用邻接法建立的系统发育树

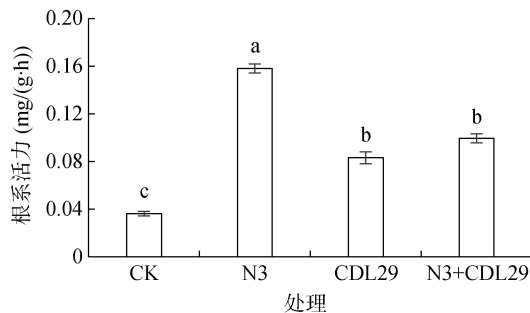
Fig. 3 Phylogenetic established by neighbor-joining method, based on 16S rDNA sequences of N3 and related strains

表 1 不同处理对二月兰生长发育的影响

Table 1 Root growth and development of *Orychophragmus violaceus* under different treatments

处理	地上部鲜重(g/株)	地下部鲜重(g/株)	株高(cm)	茎粗(mm)	根系总长(cm)	根表面积(cm ²)	根体积(cm ³)	根尖数(个)
CK	2.35 ± 0.09 c	0.44 ± 0.13 c	10.87 ± 1.05 c	2.95 ± 0.20 c	63.40 ± 2.32 c	15.57 ± 0.17 c	0.42 ± 0.01 b	157.57 ± 6.66 d
N3	7.70 ± 0.87 a	1.01 ± 0.36 a	16.97 ± 1.80 a	5.62 ± 0.33 a	144.43 ± 8.46 a	35.51 ± 1.07 a	1.04 ± 0.21 a	333.33 ± 12.10 a
CDL29	2.73 ± 0.31 c	1.10 ± 0.20 a	14.33 ± 1.13 b	3.87 ± 0.56 b	101.99 ± 2.43 b	23.86 ± 1.03 b	0.50 ± 0.01 b	203.00 ± 10.82 c
N3+CDL29	5.18 ± 1.34 b	0.65 ± 0.13 b	14.03 ± 0.29 b	3.90 ± 0.58 b	105.61 ± 0.74 b	25.83 ± 0.50 b	0.53 ± 0.02 b	224.00 ± 3.00 b

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$), 下同。



(图中不同小写字母表示处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著, 下同)

图 4 不同处理对二月兰根系活力的影响

Fig. 4 Root activities of *Orychophragmus violaceus* under different treatments

2.3.2 接种植物促生菌对二月兰盆栽土性质的影响 由表 3 可知, 接种植物促生菌对土壤 pH 影响不大, 但能够提高土壤有机质、全氮、全磷和速效养分含量。单一接种固氮菌株 N3 处理能显著提高土壤全氮、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量, 较 CK 分别提高了 0.21 倍、1.21 倍和 1.01 倍。

接种植物促生菌均有效提高土壤 MBC 和 MBN 含量, 单一接种固氮菌株 N3 处理提升效果最佳, 土壤 MBC 和 MBN 含量达 272.93 $\mu\text{g/g}$ 和 91.55 $\mu\text{g/g}$ (图 5), 复合菌株接种处理土壤 MBC 和 MBN 提升效果不如单一接种处理。

表 2 不同处理对二月兰植株养分含量的影响(g/kg)

Table 2 Nutrient contents in *Orychophragmus violaceus* under different treatments

处理	地上部			地下部		
	N	P	K	N	P	K
CK	33.00 ± 6.80 b	4.50 ± 0.50 b	28.80 ± 2.10 a	38.50 ± 4.00 b	5.50 ± 1.20 a	13.50 ± 2.00 b
N3	43.90 ± 2.10 a	7.00 ± 0.90 a	38.00 ± 6.80 a	50.00 ± 7.70 a	6.40 ± 1.10 a	20.4 ± 2.80 a
CDL29	33.20 ± 0.40 b	4.80 ± 1.20 b	30.20 ± 9.40 a	40.70 ± 1.20 ab	5.70 ± 0.70 a	17.30 ± 1.40 a
N3+CDL29	35.00 ± 2.60 ab	5.30 ± 1.30 b	32.50 ± 5.00 a	41.60 ± 6.00 ab	5.70 ± 0.20 a	17.30 ± 2.80 a

表 3 接种植物促生菌对土壤理化性质的影响

Table 3 Effects of inoculation with plant probiotics on soil physical and chemical properties

处理	pH	有机质(g/kg)	全氮(g/kg)	全磷(g/kg)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/kg)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
CK	7.7 ± 0.02 a	27.75 ± 2.61 b	1.53 ± 0.05 b	0.86 ± 0.03 b	2.01 ± 0.07 c	5.97 ± 0.44 c	38.52 ± 1.78 c	155.09 ± 9.01 b
N3	7.54 ± 0.04 a	34.11 ± 1.32 a	1.85 ± 0.06 a	0.90 ± 0.01 a	4.44 ± 0.28 a	11.98 ± 0.86 a	48.90 ± 1.23 a	188.20 ± 6.25 a
CDL29	7.66 ± 0.07 a	27.81 ± 0.86 b	1.59 ± 0.01 b	0.87 ± 0.02 ab	2.15 ± 0.04 bc	6.18 ± 0.52 c	43.23 ± 1.21 b	160.40 ± 5.14 b
N3+CDL29	7.64 ± 0.02 a	28.45 ± 0.35 b	1.60 ± 0.01 b	0.87 ± 0.01 ab	2.36 ± 0.10 b	7.25 ± 0.25 b	43.78 ± 1.78 b	162.50 ± 2.76 b

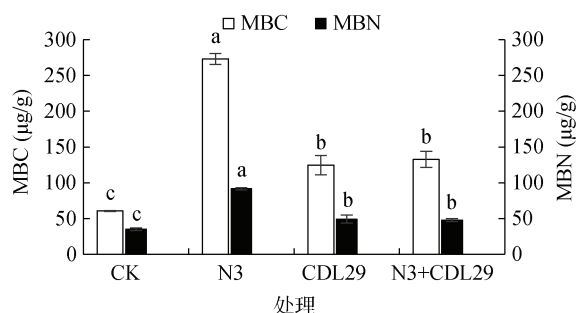


图 5 不同处理对土壤 MBC 和 MBN 含量的影响
Fig. 5 Soil MBC and MBN contents under different treatments

由图 6 可知，与 CK 相比，单一接种产 IAA 菌株 CDL29 处理并不影响土壤固氮酶活性，而单一接种固氮菌株 N3 处理能够显著提高土壤固氮酶活性，达 C_2H_4 44.97 nmol/(g·h)，与 CK 相比提升了 1.35 倍。

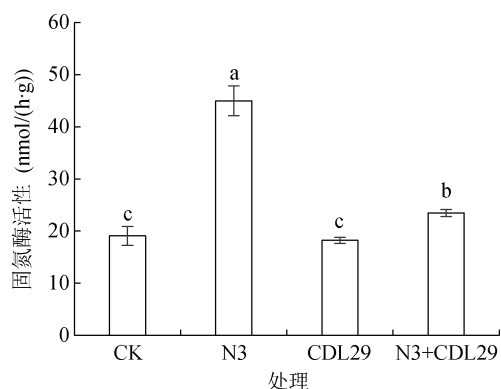


图 6 不同处理对土壤固氮酶活性影响
Fig. 6 Soil nitrogenase activities under different treatments

3 讨论

接种植物促生菌对二月兰有一定的促生作用，且不同植物促生菌对二月兰的促生效果不同，接种固氮菌株 N3 对二月兰的促生效果好于产 IAA 菌株 CDL29 和复合菌株接种处理，较不接菌处理二月兰地上部鲜重、株高和植株地上部氮、磷、钾养分含量分别显著提高了 227.66%、56.12%、33.03%、55.56% 和 31.94%。这与本实验室徐文思等^[27]筛选获得的产 IAA 菌株 JX15 和姜瑛等^[28]筛选的固氮解磷菌株 JX14 接种花生盆栽试验结果“产 IAA 菌和固氮菌对花生具有很好的促生作用，能够显著促进花生生物量和株高的增加，且两者对花生的促生效果不同”一致。由于土壤供氮是绿肥作物生长的重要限制因子，特别对于非豆科植物二月兰，接种固氮菌株对土壤固氮微生物发挥重要的作用^[29]。

接种植物促生菌对二月兰根系生长发育有较好的促生作用，根系总长、表面积、体积以及根尖数和

根系活力都显著增加，且二月兰植株地上和地下部氮、磷、钾含量都有增加的趋势。李冰等^[30]研究表明，小麦幼苗接种植物根际促生菌后，对小麦根的总长度、总表面积、根尖数有明显促生作用，且这些指标与小麦根干重、株高和茎干重显著相关。郑文波等^[31]研究表明，接种产 IAA、解磷菌株 ZH5 能提高花生根系的根长、根表面积、根体积和根尖数，说明菌株 ZH5 对花生根系生长发育有较好的促进作用，进而提高花生植株全磷养分含量。根的生长情况和活力水平直接影响地上部的生长和营养状况及产量水平。接种植物促生菌处理二月兰根系具有更多的分支并且更长更粗，增加了对养分的接触面。此外，根系活力的增加促进了二月兰对土壤中营养元素的吸收，进而提高了其地上部鲜重、株高以及氮、磷、钾养分含量。

土壤微生物作为土壤生态系统的重要组成部分，其量的变化是评价土壤肥力高低的重要依据^[32]。土壤固氮酶活性在一定程度上能够反映土壤固氮微生物固氮酶作用能力及强弱。接种固氮菌株 N3，能提高土壤脲酶活性，并且可以提高细菌总代谢活性^[33]，通过固氮作用，将空气中游离态的氮素直接转变为含氮化合物^[34]，能显著提高土壤全氮、 NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 含量。王慧桥等^[35]研究表明，不同自生固氮菌均能提高玉米土壤有效氮含量，活化的养分更有利于二月兰的生长和吸收利用。本试验表明，接种植物促生菌对土壤 pH 影响不大，但能够提高土壤有机质、全磷、有效磷和速效钾含量。接种植物促生菌均有效提高土壤 MBC 和 MBN 的含量，接种固氮菌株 N3 处理提升效果最佳，这与固氮菌株 N3 分离筛选于本试验所用土壤，属于土著微生物，相比产 IAA 菌株 CDL29 具有更好的适应性，更有利于功能的发挥有关。复合接种相比单一接种可能存在资源的竞争，从而提升效果不如单一接种处理。接种固氮菌株 N3 后，土壤固氮酶活性最高，这与固氮菌株 N3 有较强的固氮酶活性直接相关，同时土著固氮菌株 N3 的强适应能力及定殖能力也是原因之一。

4 结论

本试验筛选出了 1 株固氮能力较强的菌株 N3，固氮酶活性达 C_2H_4 28.33 nmol/(h·ml)，通过细菌形态和生化特征以及 16S rDNA 基因序列分析，鉴定为巨大芽孢杆菌属(*Bacillus megaterium*)。将该菌接种于二月兰能有效促进其生物量的增加、根系发育，提高二月兰氮、磷、钾养分的积累，同时有效提高土壤

速效养分、有机质、MBC 和 MBN 含量及固氮酶活性。接种产 IAA 菌 CDL29 同样能够促进二月兰生长,但在二月兰养分积累和土壤性质改良效果上不如接种固氮菌 N3。复合接种两株菌效果低于单一菌株处理,可见菌株之间的竞争可能会影响效果的发挥。

参考文献:

- [1] 陈兵, 任全进. 二月兰的特征特性及其应用价值[J]. 现代农业科技, 2015(9): 169.
- [2] 刘佳, 张杰, 徐昌旭, 等. 二月兰不同翻压量对土壤肥力的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2014, 32(1): 123–127.
- [3] 赵秋, 高贤彪, 宁晓光, 等. 华北地区春玉米-冬绿肥轮作对碳、氮蓄积和土壤养分以及微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(4): 1005–1011.
- [4] Gao J S, Xu M G, Dong C H, et al. Effects of long-term rice-rice-green manure cropping rotation on rice yield and soil fertility[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(2): 343.
- [5] 刘佳, 张杰, 徐昌旭, 等. 氮肥用量对诸葛菜产量及氮素吸收利用的影响[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(2): 185–189.
- [6] 白金顺, 曹卫东, 曾闹华, 等. 不同供氮量对二月兰产量、土壤无机氮残留及氮平衡的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(10): 3206–3212.
- [7] 陆宇燕, 李丕鹏. 氮肥污染的危害[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2014, 32(1): 1–5.
- [8] Liu J L, Tang L, Gao H, et al. Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(1): 281–289.
- [9] Mareque C, Taule C, Beracochea M, et al. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench)[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(2): 1057–1067.
- [10] Viruel E, Erazzú L E, Martínez Calsina L, et al. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: Effect on plant growth and yield[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2014(ahead).
- [11] 马骢毓, 张英, 孙广正, 等. 披碱草根际促生菌筛选及其接种剂的促生作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(4): 1039–1048.
- [12] Galaviz C, Lopez B R, De-Bashan L E, et al. Root growth improvement of mesquite seedlings and bacterial rhizosphere and soil community changes are induced by inoculation with plant growth-promoting bacteria and promote restoration of eroded desert soil[J]. *Land Degradation & Development*, 2018, 29(5): 1453–1466.
- [13] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 541–556.
- [14] 李琬, 刘森, 张必弦, 等. 植物根际促生菌的研究进展及其应用现状[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 1–5.
- [15] 黄晓东, 季尚宁, Bernard Glick, 等. 植物促生菌及其促生理理[J]. 现代化农业, 2002(6): 7.
- [16] 张武, 杨琳, 王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(5): 810–821.
- [17] Zhang X X, Zhang R J, Gao J S, et al. Thirty-one years of rice-rice-green manure rotations shape the rhizosphere microbial community and enrich beneficial bacteria[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 104:208–217.
- [18] 康林玉, 刘周斌, 欧立军, 等. 土壤微生物促进作物生长发育研究进展[J]. 湖南农业科学, 2017(3): 113–116.
- [19] 秦宝军. 高效固氮菌选育与土壤培肥研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2010.
- [20] 徐莉, 常大丽, 张旭辉, 等. 一种多重重金属耐性产吡啶乙酸的菌株及其应用: CN109136147A[P]. 2019-01-04.
- [21] 陈雄, 韦祎旸, 李辉信, 等. 附着菌对三氯联苯的吸附及降解机制研究[J]. 中国环境科学, 2015, 35(5): 1423–1428.
- [22] 王秀呈, 曹艳花, 唐雪, 等. 水稻内生固氮菌 *Herbaspirillum seropedicae* DX35 的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 292–298.
- [23] 阎大来, 何路红, 李季伦. 固氮螺菌与植物的相互关系研究进展[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 176–179.
- [24] Das S, De T K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay[J]. *MethodsX*, 2018, 5: 909–914.
- [25] 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.

- [26] 廖延雄. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰：氏分类细菌学手册》[J]. 微生物学通报, 1992, 19(4): 249.
- [27] 徐文思, 姜瑛, 李引, 等. 一株植物促生菌的筛选、鉴定及其对花生的促生效应研究[J]. 土壤, 2014, 46(1): 119-125.
- [28] 姜瑛, 吴越, 王国文, 等. 一株固氮解磷菌的筛选鉴定及其对花生的促生作用研究[J]. 土壤, 2015, 47(4): 698-703.
- [29] 刘璐, 何寻阳, 杜虎, 等. 喀斯特土壤固氮微生物群落与植被、土壤的关系[J]. 生态学报, 2017, 37(12): 4037-4044.
- [30] 李冰, 龚文秀, 李清, 等. 植物根际促生菌株对小麦根系发育的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(2): 276-282.
- [31] 郑文波, 申飞, 闫小梅, 等. 红壤中产吡啶乙酸并具解磷作用的促生菌筛选鉴定及促生效果研究[J]. 土壤, 2015, 47(2): 361-368.
- [32] 王艳霞, 冯宏, 李华兴, 等. 生物复混肥对土壤微生物的影响研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(6): 1206-1211.
- [33] 陈胜男, 谷洁, 付青霞, 等. 接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(2): 444-450.
- [34] Mus F, Alleman A B, Pence N, et al. Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation[J]. *Metalomics*, 2018, 10(4): 523-538.
- [35] 王慧桥, 陈为峰, 宋付朋, 等. 不同自生固氮菌对盐碱地玉米生长与土壤养分特性的影响[J]. 土壤通报, 2018, 49(6): 1341-1347.