

施解除磷菌剂对油茶根际微生物和土壤酶活性的影响

李正昀,王 舒,张 扬,张林平*,李 冬

(江西农业大学 林学院;江西特色林木资源培育与利用 2011 协同创新中心,江西 南昌 330045)

摘 要:采用盆栽油茶的 2 因素完全随机区组设计,研究了 3 种施磷水平下不同解磷菌剂对油茶苗的根际微生物数量和酶活性的影响。结果表明,添加解磷菌剂后油茶根际土壤中真菌数量减少,细菌和放线菌数量却增加,同时提高了土壤蔗糖酶和脲酶活性;各种菌剂对根际微生物数量和酶活性的影响随着施磷水平的提高而逐渐增强,且混合菌剂相对于单一菌种对根际微生物数量及酶活性的影响更显著。

关键词:油茶;解磷细菌;根际微生物;土壤酶活性

中图分类号:S794.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)01-0188-05

Effects of Different Phosphate-Solubilizing Bacteria on Rhizosphere Microorganism and Enzyme Activities of *Camellia oleifera*

LI Zhen-yun,WANG Shu,ZHANG Yang,ZHANG Lin-ping*,LI Dong

(Department of Forestry, Collaborative Innovation Center of Jiangxi Typical Trees Cultivation and Utilization, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: A potting experiment was conducted in a completely randomized block design to evaluate the effects of two phosphate-solubilizing bacteria (PSB) (*Bacillus aryabhattai*, *Pseudomonas auricularis*) and their mixture on rhizosphere soil microorganism and enzyme activities subjected to three application levels of calcium-superphosphate. The results showed that inoculation of two PSB and their mixture reduced the amounts of rhizosphere fungi, increased the amounts of bacteria and actinomyces, and enhanced activities of invertase and urease. However, the effects on rhizosphere microorganism and enzyme activities enhanced with the increase of calcium-superphosphate content, and the influence of mixed bacteria was stronger than that of any single bacterium on the amounts of microorganism and anzyme activities.

Key words: *Camellia oleifera*; phosphate-solubilizing bacterium; rhizosphere micro-organism; enzyme activity

油茶(*Camellia oleifera*)是我国特有的高级油料树种,是一种发展前景较好的经济植物。目前,我国油茶栽培面积达 24.44 万 hm^2 ,主产区为湖南、江西和广西等红壤区,土壤有效磷缺乏和磷素积累问题较为严重^[1]。为提高油茶产量,通常会施入大量的磷肥以达到增产的目的,但施入的磷肥仅有 5%~10%在当季被吸收利用,其余的磷被转化为土壤中难溶性磷酸盐^[2]。因此,如何通过生物学途径释

放土壤中无效态库存磷,对于提高油茶土壤磷素有效性,减少磷肥使用量,减轻环境污染及维持生态系统的问题具有重要意义。

解磷细菌是土壤中的一类溶解磷酸化合物能力较强的细菌的总称,可合成或分泌一些有机酸和酶类,提高土壤中有效磷含量,改变植物根际微生物的群落结构,从而促进植物的生长发育^[3-6]。目前,解磷菌剂已在农作物上开展了大量应用研究^[7-8],而在

收稿日期:2017-03-24 修回日期:2017-10-18

基金项目:国家自然科学基金(31660189);江西省自然科学基金(20161BAB204187)。

作者简介:李正昀,男,硕士研究生,研究方向:森林病理学。E-mail: lzy623320@163.com

* 通信作者:张林平,男,博士,副教授,研究方向:森林病理学。E-mail: zlping619@163.com

木本植物上应用,特别对根际土壤微生态环境和土壤酶活性的影响报道甚少^[9-10]。为此,本试验在 3 种施磷水平下,在油茶苗根际周围接种不同解磷菌剂,研究不同解磷菌剂对油茶苗根际微生物和酶活性的影响,为解磷菌剂对土壤微生态环境的影响提供科学理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株为阿耶波多杆菌(*Bacillus aryabhattai*)、耳假单胞杆菌(*Pseudomonas auricularis*),源自江西农业大学森林保护实验室,其液体培养基中的溶磷率分别为 19.75%和 11.88%^[11-12]。供试植株为油茶赣兴 46 的 1 年生嫁接苗,由江西省林业科学研究院提供。供试土壤采自江西农业大学中药园基地,采集深度为 0~20 cm,红壤土,土壤理化性质为:pH 5.25,有机质含量 43.71 mg·kg⁻¹、碱解氮含量 94.68 mg·kg⁻¹、有效磷含量 2.80 mg·kg⁻¹、速效钾含量 15.80 mg·kg⁻¹。样土风干后过筛(1 mm),并将红壤:沙土:泥炭土以 6:3:1(V:V)混合灭菌后备用。

1.2 试验设计

盆栽试验采用 2 因素完全随机区组设计,因素 1 为菌剂,共设 5 个处理:1)耳假单胞杆菌菌剂 50 mL(T1);2)阿耶波多杆菌菌剂 50 mL(T2);3)混合菌剂(T1:T2=1:1) 50 mL(T3);4)LB 培养液 50 mL 为对照(CK1);5)无菌水 50 mL 为土壤对照(CK2)。因素 2 为施磷水平,参考胡冬南^[13]等和本试验盆栽土壤的特点,共设 3 种施磷处理:P1(不施磷肥,即 0 g·kg⁻¹)、P2(过磷酸钙 1 g·kg⁻¹)、P3(过磷酸钙 2 g·kg⁻¹),每处理 5 个重复。所用磷肥含 P₂O₅ 12.4%。为满足植株对 N、K 营养的需求,每个处理均施入尿素(N 300 mg·kg⁻¹)和硝酸钾(K₂O 200 mg·kg⁻¹),并与土壤混合均匀,每盆装入 3 kg 土壤。2013 年 9 月于江西农业大学中药园温室大棚内进行盆栽试验,油茶苗正常管理。

1.3 菌剂制备及接种

将不同解磷细菌分别接种至 LB 液体培养基中培养 48 h(28℃,180 r·min⁻¹),测定各菌株悬浮液 OD₆₀₀ 值并调整至 0.5。不同解磷细菌菌悬液按 3%(v/v)分别接种至盛有 300 mL LB 培养液的三角瓶(500 mL)中,28℃,180 r·min⁻¹振荡培养至其含菌量均达到 10⁸ CFU·mL⁻¹,即为解磷细菌液体菌剂。用无菌注射器将菌剂(50 mL)分别注射至移栽成活且生长比较一致的油茶苗根际周围,CK1 每盆注射无菌水 50 mL,CK2 注射灭菌后的 LB 液体培

养基 50 mL,每个处理 10 个重复。

1.4 土壤微生物数量和酶活性测定

2014 年 4 月将带土植株取出,轻轻抖动附在根系上的土壤作为根际土壤样品,样品分成 2 份,1 份带回实验室立即进行土壤微生物测定,另一份样品风干后过筛并测定土壤酶活性^[14]。采用稀释平板法测定土壤微生物数量,具体方法参照李阜棣^[15]等,采用 NA 培养基分离细菌,改良高氏 1 号合成培养基分离放线菌,马丁氏孟加拉红培养基分离真菌。采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定土壤蔗糖酶活性,采用靛酚蓝比色法测定土壤脲酶活性,具体方法参考文献^[16],每个处理 3 个重复。

1.5 数据处理分析

试验所得数据采用 Excel 2010 软件进行分析作图,同时,应用 SPSS V13.0 软件进行双因素方差分析和多重比较。

2 结果与分 析

2.1 对根际真菌数量的影响

由图 1 可知,不同解磷菌剂的施入降低了油茶苗根际真菌整体代谢活性和数量,其中 T1、T3 减幅较多,T2 减幅最小,且与 CK1 差异显著(P<0.05)。试验对照 CK1 和 CK2 之间无显著差异(P<0.05),表明添加 LB 培养液(灭菌)对根际真菌数量无影响。

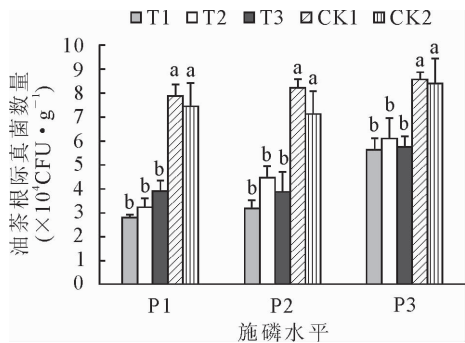


图 1 解磷菌剂对油茶苗根际真菌数量的影响

Fig. 1 Effects of PSB on the amounts of rhizosphere fungi of *C. oleifera* seedlings

2.2 对根际细菌数量的影响

由图 2 可知,不同施磷水平下接种不同解磷菌剂均可增加油茶根际细菌数量,其中 P3 水平增幅最大。根际细菌数量随着施 P 量的提高而逐渐增加,可能是因为解磷菌剂将难溶性磷转化为有效磷,有效磷含量的增加提高了土壤质量,从而增加细菌的生长和繁殖。各菌剂处理以 T3 增幅和数量最大,并显著高于 T1、T2、CK1 和 CK2(P<0.05),表明混合菌群较单一菌剂更能提高油茶苗根际细菌整

体代谢活性和数量。试验对照 CK1 和 CK2 间无显著性差异($P<0.05$),表明单独添加 LB 培养液(灭菌)对根际细菌数量无影响。

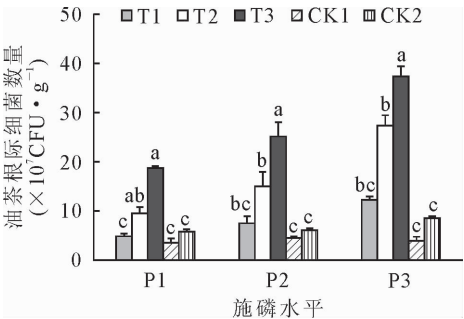


图 2 解磷菌剂对油茶苗根际细菌数量的影响

Fig. 2 Effects of PSB on the amounts of rhizosphere bacteria of *C. oleifera* seedlings

2.3 对根际放线菌数量的影响

由图 3 可知,不同施磷水平下接种不同解磷菌剂对油茶根际放线菌数量的影响不同,根际放线菌的数量均有所增加,其中 P3 水平增幅最大,随着施 P 量的提高,根际放线菌数量的增幅逐渐增加,各菌剂处理以 T3 增幅和数量最大,并显著高于 T1、T2、CK1 和 CK2($P<0.05$),表明混合菌剂较单一菌剂更利于油茶根际放线菌数量的增加。对照 CK1 和 CK2 之间无显著差异,表明单独添加 LB 培养液(灭菌)对根际放线菌数量无影响。

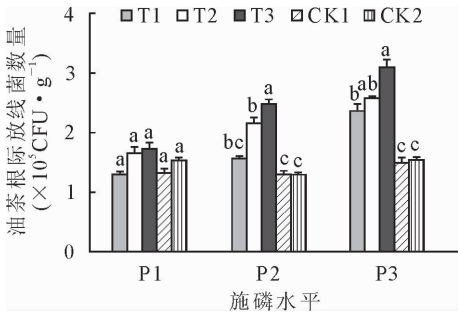


图 3 解磷菌剂对油茶苗根际放线菌数量的影响

Fig. 3 Effects of PSB on the amounts of rhizosphere actinomycetes of *Camellia oleifera* seedlings

2.4 对根际蔗糖酶活性的影响

蔗糖酶又叫转化酶,主要参与分解土壤中高分子量蔗糖,其活性表示土壤熟化程度的大小和肥力水平的高低。由图 4 可知,接种不同解磷菌剂对油茶土壤蔗糖酶活性的影响不同。在 3 种施磷水平下,与对照 CK1 相比,接种各菌剂均不同程度地提高了土壤蔗糖酶的活性,且差异显著($P<0.05$)。其中 P3 水平增幅最大,结果表明在低磷胁迫作用下,抑制了蔗糖酶活性的增加。各菌剂处理以 T3 增幅最大,并显著高于 T1、T2、CK1 和 CK2($P<$

0.05),表明混合菌剂较单一菌剂更利于油茶土壤蔗糖酶活性的增加,在一定程度上提高土壤肥力。试验对照 CK1 和 CK2 间无显著差异,表明单独添加 LB 培养液(灭菌)对根际土壤蔗糖酶活性的增加无影响。

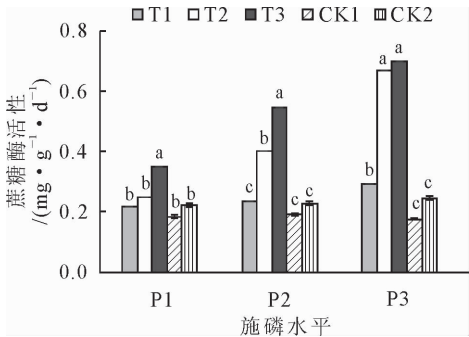


图 4 解磷菌剂对油茶苗根际土壤蔗糖酶活性的影响

Fig. 4 Effects of PSB on invertase activity of *C. oleifera* seedlings

2.5 对根际脲酶活性的影响

土壤脲酶可催化尿素水解为氨和二氧化碳,其活性高低可以反映土壤的供氮能力。由图 5 可知,各菌剂对根际脲酶活性的影响不同。相对于对照 CK1、CK2,在不同施磷水平下接种不同菌剂后根际土壤脲酶活性均有不同程度提高,但差异均不显著。试验对照 CK1 和 CK2 之间无显著差异,表明单独添加 LB 培养液(灭菌)对根际土壤脲酶活性的增加无影响。

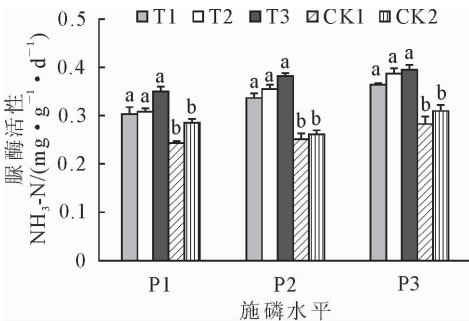


图 5 解磷菌剂对油茶苗根际土壤脲酶活性的影响

Fig. 5 Effects of PSB on urease activity of *C. oleifera* seedlings

3 结论与讨论

土壤微生物(真菌、细菌、放线菌)是土壤生态系统中的重要组成部分,其群落的组成和活性对土壤肥力的保持和提高具有重要意义^[17-19]。本研究采用接种法研究了施入不同解磷菌剂对油茶苗根际微生物群落数量的影响,结果表明,分别接种阿耶波多杆菌、耳假单胞杆菌及其混合菌群后,根际细菌和放线菌数量较对照均有所增加,而真菌数量减少,这和余

旋^[9]、董卿^[20]、栗丽^[21]等研究结果一致。根际细菌和放线菌数量增加,有利于改善根际土壤的微生态环境,进而提高土壤肥力和促进植物根系发育及养分吸收^[22]。土壤真菌是重要的物质分解者,却与许多植物土传病害有关^[23]。本研究仅对油茶苗接种解磷菌剂后一个生长时期内根际微生物的数量变化进行分析,不同时期根际微生物数量变化及优势菌群的变化规律及其相关性有待于进一步研究。

土壤酶活性能够反映土壤质量在时间序列或各种不同条件下的变化,而解磷菌剂对根际微生物数量及酶活性的影响与施入的磷素水平密切相关。有关研究表明解磷菌剂在不施入 P 肥时对根际微生物数量及酶活性的影响>施入 P 肥^[9-10],这与本研究结果正好是相反的,说明施磷具有提高土壤酶活性的作用。植物在土壤低磷条件下,根系表面积、生物量、根毛数量和长度等均有所增加,且根系分泌物如各种有机酸的含量和酶活性有所提高,可将土壤中难溶态磷转化成可溶性磷,更好地被植物吸收^[24-25]。本试验中土壤酶与土壤微生物之间具有密切的关系,与前人研究结果一致^[26],说明微生物生命代谢活动的增强能够提高土壤酶活性,进而加速了土壤中物质转化,为微生物创造良好的土壤微生态环境。

众多研究表明,不同解磷细菌之间具有协同作用,混合接种要比其中任何一种单一接种更能促进植株生长和营养吸收^[27-28],这与本研究结果是一致的,主要是由于混合菌群在根际养分和生态位的竞争中更有优势,且 2 株高效解磷菌剂分离自油茶根际^[11-12],能在根际或根部有效定殖,从而发挥解磷功效,至于不同解磷细菌之间协同作用机制需进一步深入研究。此外,本研究主要采用传统的平板培养法进行微生物培养和计数,存在一定局限性,因为土壤中有很多无法正常培养的微生物,因此,采用 DGGE、RFLP 或高通量测序等技术进行土壤微生物的研究是必要的,可提高试验结果的准确性。

参考文献:

[1] 赵其国,黄国勤,马艳芹. 中国南方红壤生态系统面临的问题及对策[J]. 生态学报,2013,33(24): 7615-7622.
ZHAO Q G, HUANG G Q, MA Y Q. The problems in red soil ecosystem in southern of China and its countermeasures [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(24): 7615-7622. (in Chinese)

[2] WAKELIN S A, WARREN R A, HARVEY P R, *et al.* Phosphate solubilization by *Penicillium* sp. closely associated with wheat roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2004, 40(1): 36-43.

[3] 毕银丽,任婧. 接种菌根对根际微生物群落和磷营养的影响[J]. 能源环境保护, 2007, 21(3): 25-28.

BI Y L, REN J. Effect of inoculated AM fungi of microorganism and phosphorus concentration in rhizosphere soil [J]. Energy Environmental Protection, 2007, 21(3): 25-28. (in Chinese)

[4] 钟传青,黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 286-294.
ZHONG C Q, HUANG W Y. Comparison in P-solubilizing effects between different P-solubilizing microbes and variation of activities of their phosphatases [J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(2): 286-294. (in Chinese)

[5] CHEN Y P, REKHA P D, ARUN A B, *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Appl. Soil Ecol., 2006, 34(1): 33-41.

[6] KOKALIS-BURELLE N, KLOEPPER J W, REDDY M S. Plant growth-promoting rhizo- bacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms[J]. Appl. Soil Ecol., 2006, 31(1/2): 91-100.

[7] 朱培森,杨光明,徐阳春,等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112.
ZHU P M, YANG X M, XU Y C, *et al.* High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(1): 107-112. (in Chinese)

[8] EKIN Z. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(25): 3794-3800.

[9] 余旋,朱天辉,刘旭. 不同解磷菌剂对美国山核桃根际微生物和酶活性的影响[J]. 林业科学, 2012, 48(2): 117-123.
YU X, ZHU T H, LIU X. Effects of different phosphate-solubilizing bacteria on rhizosphere microorganism and enzyme activities of pecan seedling [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(2): 117-123. (in Chinese)

[10] 洪坚平,郝晶,毕理智,等. 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.
HONG J P, HAO J, BI L Z, *et al.* Effects of different phosphate-dissolving groups of microorganism on soil nutrient and enzymatic activity in rape [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(5): 51-54. (in Chinese)

[11] 王舒,张林平,张 扬,等. 红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 409-416.
WANG S, ZHANG L P, ZHANG Y, *et al.* Screening, identification and phosphate solubilizing capability of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of *Camellia oleifera* Abel at red soil region [J]. Forest Research, 2015, 28(3): 409-416. (in Chinese)

[12] 王舒,张林平,郝菲菲,等. 油茶根际高效溶磷细菌的筛选、鉴定及其安全性测试[J]. 林业科学研究, 2015, 28(2): 166-172.
WANG S, ZHANG L P, HAO F F, *et al.* Screening, identification and security test of *Camellia oleifera* rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria [J]. Forest Research, 2015, 28(2): 166-172. (in Chinese)

[13] 胡冬南,刘亮英,张文元,等. 江西油茶林地土壤养分限制因子分析[J]. 经济林研究,2013,31(1): 1-6.
HU D N,LIU L Y,ZHANG W Y,*et al.* Analysis on limiting factors of soil nutrient of *Camellia oleifera* forest in Jiangxi [J]. Nonwood Forest Research, 2013, 31(1): 1-6. (in Chinese)

[14] 赵颖,史晓爽,周连仁,等. 土壤样品风干后对土壤酶活性的影响[J]. 东北农业大学学报,2011,42(11): 126-129.
ZHAO Y,SHI X S,ZHOU L R,*et al.* Effect of air-drying on enzyme activities of soil samples [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2011,42(11): 126-129. (in Chinese)

[15] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社,1996:98-101.

[16] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986:78-81.

[17] 孙薇,钱勋,付青霞,等. 生物有机肥对秦巴山区核桃园土壤微生物群落和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2013,19(5): 1224-1233.
SUN W,QIAN X,FU Q X,*et al.* Effects of bio-organic fertilizer on soil microbial community and enzymes activities in walnut orchards of the Qinling-Bashan region [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(5): 1224-1233. (in Chinese)

[18] 李陆平,廖超英,李晓明,等. 毛乌素沙地樟子松人工林对土壤微生物及酶活性的影响[J]. 西北林学院学报,2012,27(3): 12-16.
LI L P,LIAO C Y,LI X M,*et al.* Effects on soil microorganism and enzyme activities of artificial *Pinus sylvestris* var. mongolica in Mu Us sand land [J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(3): 12-16. (in Chinese)

[19] 李君,李玉武,舒常庆,等. 海南儋州橡胶林下土壤微生物功能研究[J]. 西北林学院学报,2015,30(5): 7-14.
LI J,LI Y W,SHU C Q,*et al.* Soil microbial function of rubber plantation in Danzhou, Hainan island [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(5): 7-14. (in Chinese)

[20] 董卿,程红艳,张建国,等. 醋糟菌糠对3种作物土壤微生物及酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报,2016,24(12): 1655-1662.
DONG Q,CHENG H Y,ZHANG J G,*et al.* Effect of fungus chaff on soil microbe population and enzyme activity of three crop soils [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2016, 24(12): 1655-1662. (in Chinese)

[21] 栗丽,李延亮,孟会生,等. 菌剂与肥料配施对矿区复垦土壤养分及微生物学特性的影响[J]. 应用与环境生物学报,2016,22(6): 1156-1160.
LI L,LI Y L,MENG H S,*et al.* Effects of combined application of microbial agents and fertilizers on soil nutrients and microbial characteristics in reclaimed soil [J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol. , 2016, 22(6): 1156-1160. (in Chinese)

[22] 许艳丽,张红骥,张匀华,等. 施用根腐病生防颗粒剂对大豆土壤微生物区系的影响[J]. 大豆科学,2007,26(2): 198-203.
XU Y L,ZHANG H J,ZHANG Y H,*et al.* The effect of bio-control agents of trichoderma against soybean root rot on soil microorganism [J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 198-203. (in Chinese)

[23] 张信娣,史永军,陈银科. 光合细菌和有机肥对土壤主要微生物类群的影响[J]. 中国土壤与肥料,2007(3):59-62.
ZHANG X D,SHI Y J,CHEN Y K. Influence of photosynthetic bacteria and organic fertilizer on the main soil microorganism section system [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2007(3): 59-62. (in Chinese)

[24] LAMBERS H,SHANE M W,CRAMER M D,*et al.* Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits [J]. Ann. Bot. ,2006,98(4): 693-713.

[25] PANG J Y,RYAN M H,TIBBETT M,*et al.* Variation in morphological and physiological parameters in herbaceous perennial legumes in response to phosphorus supply [J]. Plant & Soil,2010,331(1/2): 241-255.

[26] 黄继川,彭智平,于俊红,等. 施用玉米秸秆堆肥对盆栽芥菜土壤酶活性 和微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(2): 348-353.
HUANG J C,PENG Z P,YU J H,*et al.* Impacts of applying corn-straw compost on microorganism and enzyme activities in pot sol cultivated with mustard [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2010,16(2): 348-353. (in Chinese)

[27] GUIAZÙ L B,ANDRÉS J A,PAPA M F,*et al.* Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti* [J]. Biol. Fertil. Soils,2010,46(2): 185-190.

[28] MADHAIYAN M,POONGUZHALI S,KANG B G,*et al.* Effect of co-inoculation of methylobacterium oryzae with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice [J]. Plant & Soil,2010,328(1/2): 71-82.