

张云霞, 雷鹏, 许宗奇, 等. 一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生物生态和小麦生长的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1073-1080.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.019

一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生物生态和小麦生长的影响

张云霞¹, 雷鹏¹, 许宗奇¹, 冯小海¹, 徐虹¹, 许仙菊²

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 211816; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为开发高效解磷微生物菌肥, 提高磷肥利用效率, 从磷矿土壤中筛选出 1 株高效解磷菌, 经 16S rDNA 鉴定为枯草芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus subtilis* JT-1, 通过钼锑抗比色法对其解磷能力进行定量分析, 并通过 GC-MS 定性分析其代谢产物中的有机酸成分。将该解磷菌制备成菌剂施用于土壤和盆栽小麦, 对土壤中有效磷含量、可培养微生物数量和微生物群落多样性进行了分析, 同时测定了小麦的基本生长指标及对磷肥的利用效率。结果表明, *B. subtilis* JT-1 在难溶磷培养基中的解磷率高达 38.69%, 具有分泌苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、柠檬酸等溶磷有机酸的特性。施入土壤后可有效提高土壤中可溶磷含量和可培养微生物的数量, 明显提高土壤微生物群落结构的多样性。此外, 菌株 JT-1 还提高了磷肥的利用率 10.79 个百分点, 促进小麦增产 12.31%。因此, 筛选到的解磷菌 *B. subtilis* JT-1 具有较高的理论研究意义和应用价值。

关键词: 解磷菌; 解磷率; 土壤微生物; 磷肥利用率

中图分类号: S154.38⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1073-08

Screening of a high-efficiency phosphate solubilizing bacterium *Bacillus subtilis* JT-1 and its effects on soil microecology and wheat growth

ZHANG Yun-xia¹, LEI Peng¹, XU Zong-qi¹, FENG Xiao-hai¹, XU Hong¹, XU Xian-ju²

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to develop high-efficiency phosphate solubilizing microbial fertilizer and improve the utilization efficiency of soil phosphate fertilizer, a bacterium was isolated from mineral phosphate soil. By 16S rDNA sequencing, the strain was identified as *Bacillus subtilis* and named *B. subtilis* JT-1. The phosphate solubilizing capacity of JT-1 was quantified by Mo-Sb colorimetry, and organic acids in the metabolites were identified by GC-MS. *B. subtilis* JT-1 prepared as microbial fertilizer was applied to pot-cultured wheat the available phosphorus, microorganism count, and diversity of microbial species in the soil were analysed, and the growth indicators and phosphate utilization efficiency were measured.

收稿日期: 2015-12-31

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2015AA020951); 国家自然科学基金青年基金项目(21506098); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150946); 江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB530007)

作者简介: 张云霞(1991-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事高效解磷菌的筛选及相关菌肥产品研发。(E-mail)xyz36900963@163.com

通讯作者: 徐虹, (E-mail)xuh@njtech.edu.cn

The results showed that the phosphate-dissolving rate of *B. subtilis* JT-1 was as high as 38.69% on insoluble phosphate medium, and it secreted malic acid, fumaric acid, succinic acid and citric acid. The content of available phosphorus, the microbial population, as well as the diversity of microbial species in soil were improved by *B. subtilis* JT-1. In addition, the utilization of phosphate fertilizer was increased by 10.79 percent points and wheat yield was enhanced by 12.31%. The research implies that *B. subtilis* JT-1 is of high theoretic significance and practical values.

Key words: phosphate-solubilizing bacterium; phosphate-solubilizing rate; soil microecology; utilization of phosphate fertilizer

磷是植物生长发育不可缺少的大量元素之一,对促进植物的生长发育和新陈代谢起着重要的作用^[1]。中国74%的耕地土壤缺磷,其含量低于5 mg/kg的耕地占总耕地面积的56.17%,5~10 mg/kg的占30.55%,高于10 mg/kg的仅为13.97%^[2]。在农业生产中磷素化肥施用是必须的,但是磷肥利用率却很低,磷肥的当季利用率一般只有10%~20%,施入的磷肥大部分被土壤中的钙、铁、铝等固定,不能被植物吸收利用。此外化肥的长期使用会造成土壤板结、土壤保水力下降、土地退化等不良后果^[3]。

解磷微生物能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态^[1,4]。磷矿区土壤中解磷微生物数量和种群丰度普遍较高^[5]。目前,解磷菌对难溶无机磷酸盐的解磷机制一般认为是由于菌体生长过程中产生各种有机酸,而将其中的磷溶解释放出来,即酸解作用^[6-7]。大量研究表明,解磷微生物在缺磷环境中会产生一定量的有机酸,使环境pH值降低,也可以与铝、铁、钙等离子结合,从而达到溶磷的目的^[8]。Sperber^[9]研究结果表明,解磷细菌产生的有机酸主要有乳酸、羟基乙酸、延胡索酸、琥珀酸等。

在农业生产上,解磷菌的主要应用有制作解磷微生物肥料,控制农业面源污染,改善土壤酸化。将含有解磷细菌的生物肥料施入土壤,解磷细菌的生长代谢可以在植物根际形成一个磷素供应较充分的微区,从而使植物获得较充足的磷营养以促进生长发育^[3],同时还可以减少磷肥的施入,保护生态环境^[8]。因此,土壤解磷微生物的研究具有良好的发展前景和应用意义。

本研究从磷矿区土壤中筛选解磷菌,分析其解磷能力,研究其解磷机理,并将筛选到的解磷菌制成菌剂施用于土壤,测定土壤中微生物群落结构及有效磷的变化以评估解磷菌对土壤环境的影响,并通过小麦盆栽试验评估解磷菌菌剂对小麦生长的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、作物品种及培养基

菌株 *Bacillus subtilis* 168 由南京工业大学食品与轻工学院实验室保存。供试小麦品种为宁麦13。

解磷菌筛选培养基:葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, Ca₃(PO₄)₂ 5.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 30 mg, MnSO₄ · 4H₂O 30 mg, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.5。

种子培养基:牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 水 1 000 ml。

发酵培养基:葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MnSO₄ · 4H₂O 30 mg, 水 1 000 ml, pH 7.0。

1.2 解磷菌的筛选

于湖北省宜昌杉树垭磷矿地区进行土壤取样。称取1 g 研磨后的土样,加入10 ml 无菌水振荡15 min,取1 ml 土壤悬液放入灭菌的试管中,用无菌水梯度稀释1×10¹、1×10²、1×10³、1×10⁴、1×10⁵倍^[10]。分别取上述土壤稀释液0.5 ml,均匀涂布到解磷菌筛选培养基平板上。将平板置于30℃恒温培养96 h后,挑取平板上溶磷圈较大的菌落,将其接种到解磷菌筛选培养基中,30℃恒温振荡培养96 h后,用钼锑抗比色法^[11]测定培养液中的可溶磷含量,并选取解磷效果最佳的菌株作为后续试验研究对象。

1.3 菌株的鉴定

参照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书提取菌株的16S rDNA,提取的16S rDNA 由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。将所测16S rDNA 序列导入 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中进行比较,通过构建系统发育树,鉴定菌株。

1.4 解磷菌在难溶磷培养基中的生物量、pH 及解磷量变化

将解磷菌株接种于种子培养基中,30℃培养18 h后得到种子液。按照2%的接种量在解磷菌筛选培养基中接入种子液,然后30℃、200 r/min 的条件下振荡培养,每隔12 h取1瓶培养液进行OD值(660 nm)、pH值和可溶性磷含量测定,连续测定96 h。其中,测定OD值时将发酵液稀释25倍;测定可溶性磷含量时,将发酵培养液4 000 r/min 离心20 min,然后将上清液定容至50 ml,按照钼锑抗比色法测定上清液中可溶性磷含量。

1.5 解磷菌培养液中有机酸的定性分析

将解磷菌株按照方法1.4接入解磷菌筛选培养

基中,30 ℃ 恒温振荡培养 48 h。将培养好的发酵液 4 000 r/min 离心 20 min,上清液定容至 50 ml,取 10 ml 在冷冻干燥机上冻干。向冻干产物中加入 10 ml 体积比为 10:1 的甲醇-浓硫酸混合溶液,震荡 2 min,55 ℃ 水浴 4 h,冷却后 4 ℃ 静置 12 h,然后加入 10 ml 正己烷,震荡 2 min 后静置分层,小心收集上层有机相,用无水硫酸钠脱水后定容至 10 ml^[12]。

用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)测定萃取液,色谱条件:色谱柱 DB-5,采用程序升温,初温 50 ℃,以 6 ℃/min 速度升温至 270 ℃,进样口温度为 250 ℃,载气为高纯氦气(He),流速 1.0 ml/min,进样量 1.0 μl。

1.6 解磷菌菌剂的制备

将解磷菌株接种于种子培养基中,培养 18 h。将培养好的种子液按 2% 的接种量接种至发酵培养基中,30 ℃ 培养 48 h 后得到发酵液。将发酵液 6 000 r/min 离心 10 min 后用无菌水冲洗,重复离心冲洗 2 次。然后向离心所得的菌体中加入无菌水进行稀释,至菌体数量为 2×10^7 CFU/ml。

1.7 土壤试验

选用耕层 0~30 cm 的土壤,研究解磷菌菌剂对土壤磷素含量及微生物群落结构的影响。土壤风干粉碎后,测定土壤基础磷素含量,结果为全磷含量 87.4 mg/kg,速效磷 12.7 mg/kg。将土壤装入塑料花盆(底直径 10 cm,高 11 cm)中,每盆装 0.3 kg,共装 12 盆。将 12 盆土分成 4 个处理:处理 1(S1)不加菌剂,作为空白对照;处理 2(S2)先将土壤灭菌后,再加入解磷菌菌剂(菌剂用量每盆 0.5 ml);处理 3(S3)土壤不灭菌,加枯草 168(菌剂制备方式同解磷菌菌剂,菌剂用量同 S2);处理 4(S4)土壤不灭菌,解磷菌菌剂(菌剂用量同 S2)。为突显解磷效果,每盆土壤中均匀混入 66.6 mg $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (P_2O_5 含量为 100 mg/kg),处理过的土壤在室温下放置,保持含水量 28%。分别在处理后第 0 d、5 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 进行取样,每次取 15 g 进行土壤可培养微生物数量测定和土壤微生物群落结构分析。

土壤可培养微生物数量分析:采用稀释平板计数法测定,准确称取 1 g 土壤,加入 10 ml 无菌水制成悬浮液,然后进行 10 倍系列稀释涂布。细菌、放线菌、真菌分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、高斯一号培养基、玫瑰红钠琼脂培养基。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析土壤微生物群

落结构:准确称取 0.5 g 土壤样品,参照 UltraClean Soil DNA 土壤 DNA 提取试剂盒(MoBio Loker Ave West, Carlsbad, CA)说明书提取土壤总 DNA^[13]。提取的总 DNA 使用引物 518R (5'-ATTACCGCGGCT-GCTGG-3'), GC^a-338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。将扩增后的 PCR 产物进行 DGGE 凝胶电泳,条件为:凝胶浓度 8%,变性梯度 45%~70%,于 100 V、60 ℃ 下电泳 12 h,然后再将胶片染色后观察、拍照,运用 Quality One 软件处理,进行聚类分析^[14]。

1.8 小麦盆栽试验

选用耕层 0~30 cm 的土壤,将土壤风干粉碎后,装入塑料花盆中(底直径 25 cm,高 29 cm),每盆装土 3 kg,共装 20 盆。将 20 盆土随机分成 5 个处理:处理 0(P0),施用氮肥+钾肥,空白对照;处理 1(P1),施用氮肥+钾肥+磷肥;处理 2(P2),施用氮肥+钾肥+磷肥+解磷菌剂;处理 3(P3),施用氮肥+钾肥+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$;处理 4(P4),施用氮肥+钾肥+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +解磷菌剂。解磷菌剂用量为每盆 2 ml。菌剂加适量无菌水稀释,将种子浸入菌剂 1~2 h 后取出,阴干后播种,剩余菌剂播种时一起施入土壤^[14]。所用氮肥为尿素(用量为 326 mg/kg),磷肥选用过磷酸钙(P_2O_5 含量 12%,用量为 833 mg/kg),钾肥选用硫酸钾(用量为 288 mg/kg), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (P_2O_5 含量 45%,用量为 222 mg/kg)。待小麦成熟后测定小麦产量及磷肥利用率。磷肥利用率=(施磷区植株吸收 P_2O_5 总量-空白区植株吸收 P_2O_5 总量)/施用 P_2O_5 量×100%。

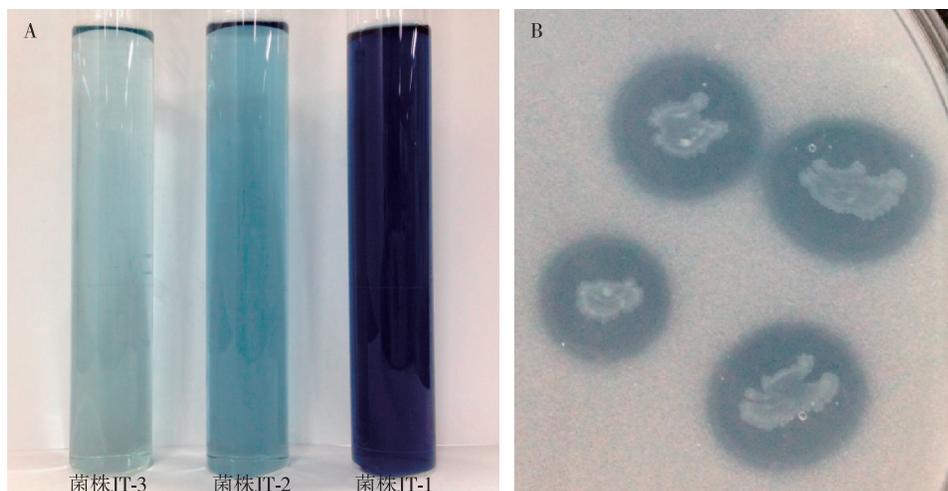
2 结果

2.1 高效解磷菌筛选

解磷菌能在含难溶性磷酸盐 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的平板上形成肉眼可见的透明圈,可以根据溶磷圈直径大小判断解磷菌解磷能力的强弱。本研究从磷矿区土壤中初步筛选出 3 株具有较强解磷能力的菌株(命名为 JT-1、JT-2 和 JT-3)。将初筛得到的 3 株菌株在含难溶磷的液体培养基中培养 4 d 后,与空白相比,可溶性磷含量分别增加了 318.60 mg/L、76.35 mg/L 和 34.50 mg/L(图 1)。特别是解磷菌 JT-1 的解磷能力远大于其他 2 株,故本研究选取菌株 JT-1 作为后续试验的研究对象。

将菌株 JT-1 的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对,结果表明菌株 JT-1 与 *B. subtilis* 的同

源性达到 99%(图 2),因此,鉴定菌株 JT-1 为枯草芽孢杆菌,命名为 *B. subtilis* JT-1。



A: 初筛得到的 3 株菌株解磷能力比较,颜色越深代表解磷能力越强;B: 菌株 JT-1 在含难溶磷培养基上的菌落形态及溶磷圈状态。

图 1 高效解磷菌的筛选

Fig.1 The phosphate solubilization of strain JT-1

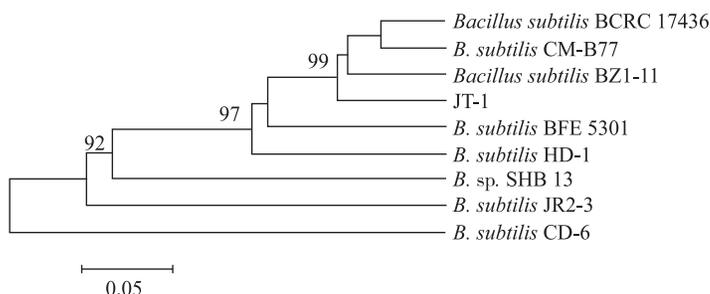


图 2 菌株 JT-1 系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain JT-1 and related strains based on ITS

2.2 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 在含难溶磷培养基中的生物量、pH 及解磷量变化

在含难溶磷培养基中,菌株 JT-1 的生物量随着时间的变化而增加,在第 36 h 时达到最大,此时 OD 值为 0.56;解磷菌 JT-1 的解磷能力也随着时间的变化而增加,在 48 h 时解磷率达到最大,为 38.69%,此时解磷量为 386.25 mg/L,随后趋于平缓且略有降低;而培养液的 pH 则一直保持降低的趋势,由培养初始值 7.0 最终降低到 4.4(图 3)。

2.3 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 发酵液中有机酸分析

将菌株 JT-1 的发酵液进行 GC-MS 分析鉴定,发现发酵液中主要存在 4 种小分子有机酸(图 4),分别为苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、柠檬酸。

2.4 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤中可培养微生物数量的影响

如图 5 所示,与对照 S1 相比,处理 S3 和 S4 土壤中可培养细菌、真菌、放线菌数量均显著提高,说明向土壤中添加解磷菌(枯草芽孢杆菌)可以增加土壤中微生物的数量。在取样时间内,处理 S4 的可培养微生物数量始终显著大于处理 S3。而处理 S2 土壤中可培养微生物数量显著低于处理 S1,说明处理 S4 中可培养微生物数量增长是 *B. subtilis* JT-1 与多种微生物共同作用的结果,并非引入 *B. subtilis* JT-1 后大量增殖的结果。在处理 30 d 后,处理 S4 土壤中可培养细菌、真菌及放线菌的数量与处理 S1 对比,分别提高了 158.33%、

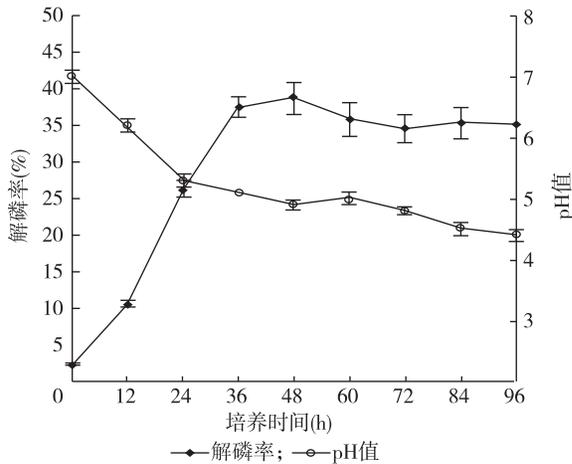


图3 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 在难溶磷培养基中的生物量、pH 及解磷量变化

Fig.3 Changes of OD, pH value and phosphorus-solubilizing rate in insoluble phosphorus medium of *B. subtilis* JT-1

210.26%和128.00%,与处理S2对比分别提高了226.32%、290.32%和235.29%,与处理S3对比分别提高了87.88%、45.78%和18.75%。这表明菌株JT-1可以通过与土壤微生物之间的互作,增加土壤可培养微生物的数量,并且这种效果远远优于普通的枯草芽孢杆菌。

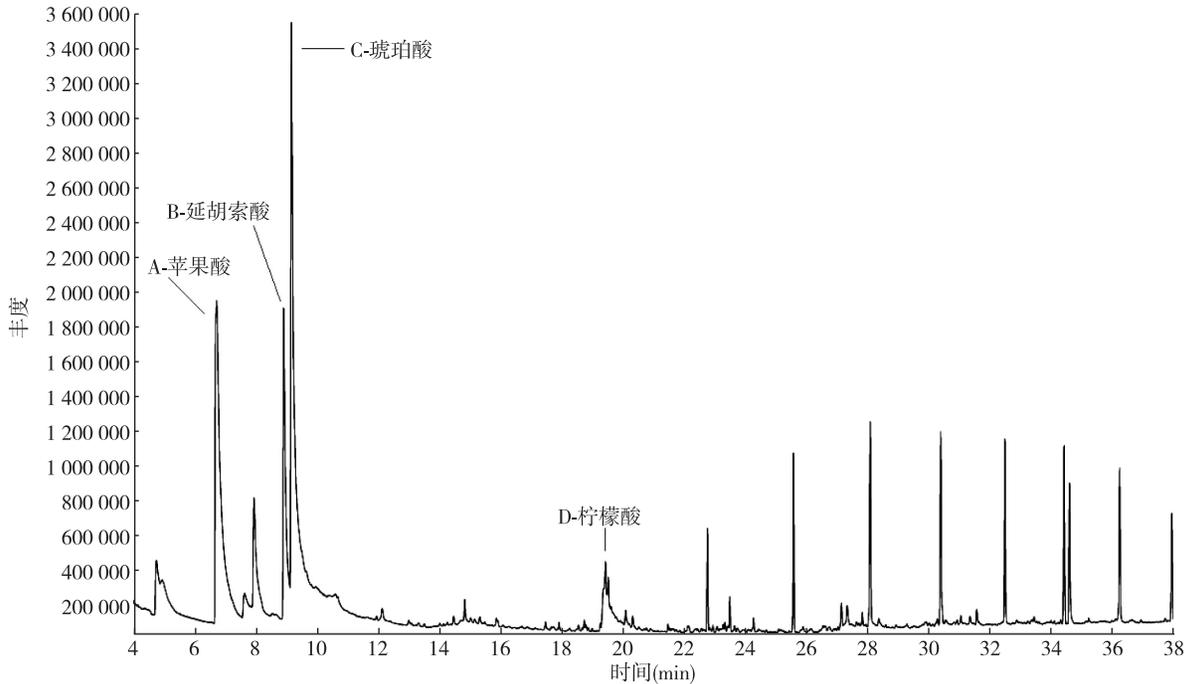


图4 解磷菌菌株 JT-1 发酵液中有有机酸 GC-MS 定性分析图

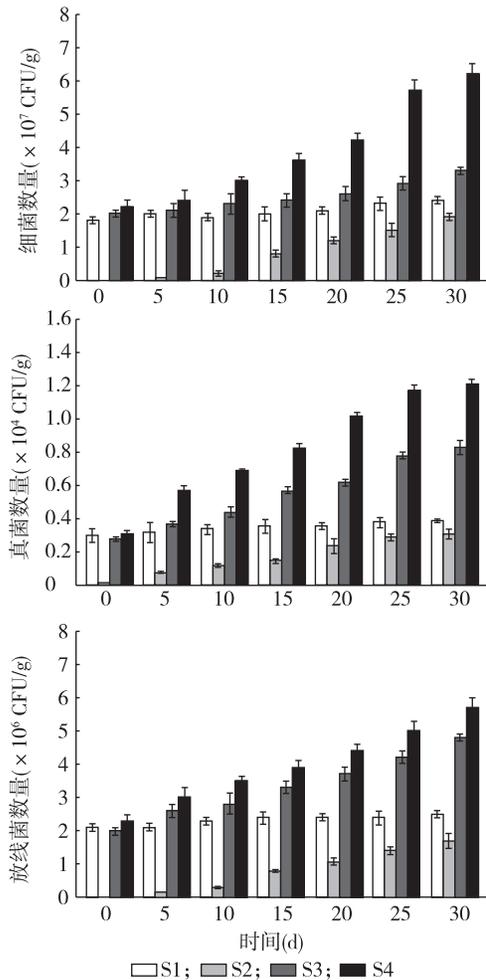
Fig.4 GC-MS detection of organic acids in strain JT-1 metabolite

2.5 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤可溶磷含量的影响

解磷菌在土壤中具有较强的解磷能力,且能维持较长时间。图6显示,在土壤中添加解磷菌剂JT-1(处理S2和S4)的条件下,土壤中可溶磷含量随着时间的延长升高,其中处理S2在第20d时可溶磷含量达到最大值(34.20 mg/kg),对照S1土壤中有效磷含量始终保持在较低水平,说明解磷菌 *B. subtilis* JT-1 确实能将土壤中的难溶磷高效转化为有效磷。而处理S2中可溶磷含量高于处理S4可能与处理S2中微生物总量较少,有效磷消耗较少有关。对比处理S3与处理S4可见,普通枯草芽孢杆菌(枯草168)在土壤中不具备较强的解磷能力,本研究筛选的菌株JT-1解磷能力显著优于普通枯草芽孢杆菌。

2.6 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤微生物多样性的影响

通过DGGE土壤细菌条带分析结果(图7)可以看出,对照S1中细菌条带数随时间变化不显著,处理S2的条带数最少。处理S3和S4的条带数均高于S1,且条带颜色较深。在第30d时,处理S4的细菌条带数最高最亮,与处理S1、S2、S3相比,分别提高了29.19%、39.95%和12.77%。以上结果表明,



S1: 不加菌剂,空白对照;S2:先将土壤灭菌后,再加入解磷菌菌剂;S3:土壤不灭菌加枯草 168;S4:土壤不灭菌加解磷菌菌剂。

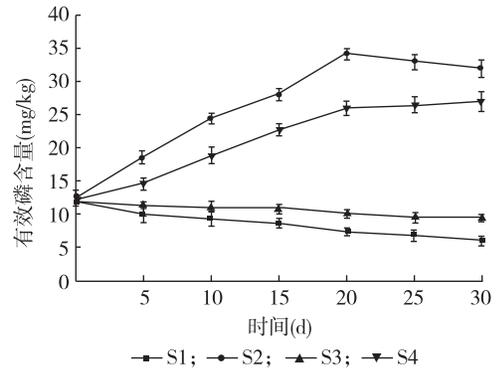
图5 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤中可培养微生物数量的影响

Fig. 5 Effect of *B. subtilis* JT-1 on soil culturable microorganism quantity

解磷菌 JT-1 明显影响了土壤微生物群落结构的多样性,且施用解磷菌 JT-1 比施用枯草 168 菌株对土壤微生物群落结构多样性的影响更大。

2.7 解磷菌剂对盆栽小麦生长的影响

在小麦盆栽试验中,解磷菌剂明显促进了小麦的生长,提高了分蘖数、千粒质量、穗粒数和种子总质量。处理 P2 小麦产量由对照 P1 的每盆 10.72 g 提高到 12.04 g,产量显著提高了 12.31%(表 1),磷肥的利用率从 18.88% 增加到 29.67%,提高了 10.79 个百分点(表 2),说明解磷菌可以有效提高磷肥的利用率。处理 P3 土壤中因施用了难溶磷 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为肥料,小麦产量降低 8.40%,磷肥利用



S1: 不加菌剂,空白对照;S2:先将土壤灭菌后,再加入解磷菌菌剂;S3:土壤不灭菌加枯草 168;S4:土壤不灭菌加解磷菌菌剂。

图6 解磷菌 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤可溶磷含量的影响

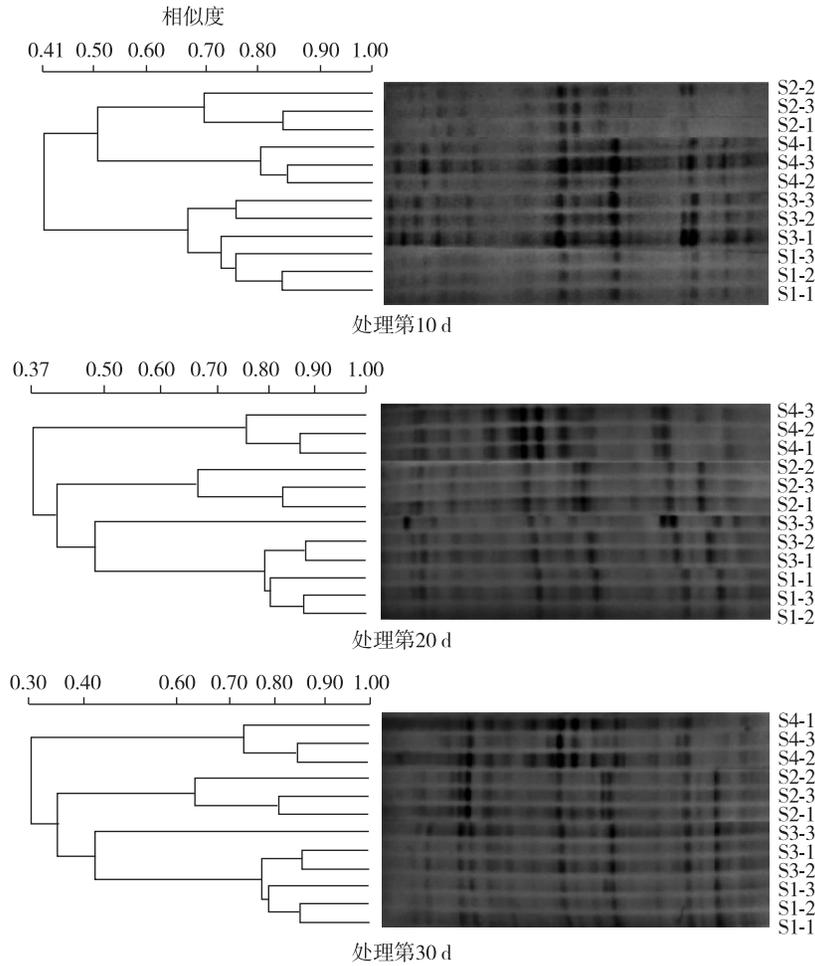
Fig. 6 Effect of *B. subtilis* JT-1 on available phosphate content in soil

率降低 13.03 个百分点,可见难溶磷难以被小麦吸收利用。处理 P4 小麦产量与对照 P1 相比差别较小,但却显著高于 P3,说明解磷菌可以缓解难溶磷难以利用的情况,提高难溶磷的利用率。

3 讨论

土壤中能解磷的微生物种类繁多,有解磷细菌、解磷真菌和解磷放线菌等。解磷细菌主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 细菌、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 细菌、固氮菌属 (*Azotobacter*) 细菌等^[15]。不同菌株的解磷能力不同。本研究筛选出的解磷菌 JT-1 的解磷量为 386.25 mg/L,解磷率为 38.69%,高于国内外报道的其他解磷菌在相同条件下溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的能力。例如余贤美等^[16]获得的解磷细菌溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的量最高为 218.60 mg/L,解磷率为 10.95%。戴沈艳等^[17]获得的解磷细菌解无机磷能力为 240.1 mg/L,解磷率为 24.05%。而对枯草芽孢杆菌溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 能力的研究中,陈令等^[18]获得的枯草芽孢杆菌解磷率仅为 4.86%,麻瑞阳等^[19]获得的一株枯草芽孢杆菌 NX-11 的解磷率仅为 3.12%。因此,本研究筛选的 *B. subtilis* JT-1 是一株高效解磷菌。

目前被人们广泛接受的微生物解磷机理是产酸机制,许多科学家通过研究发现,大部分解磷微生物在代谢过程中会产生柠檬酸、乳酸、琥珀酸等有机酸。这些有机酸,既能降低培养基的 pH 值,又能与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等离子螯合而使难溶性磷酸盐



S1-1,S1-2,S1-3 为处理 S1 的 3 次重复,其余类推。S1~S4 见图 5 注。

图 7 *B. subtilis* JT-1 菌剂对土壤微生物多样性的影响

Fig.7 Effect of *B. subtilis* JT-1 on soil microorganism diversity

表 1 小麦盆栽试验中不同处理条件下小麦的生长状况

Table 1 Wheat growth indicators in various treatments in the pot experiment

处理	每盆分蘖数	千粒质量 (g)	穗粒数	每盆种子质量 (g)
P0	8.73 ± 0.64b	27.53 ± 0.83c	21.89 ± 0.52d	6.58 ± 0.26d
P1	13.24 ± 0.82a	30.62 ± 0.87ab	26.44 ± 0.41b	10.72 ± 0.39b
P2	13.92 ± 1.00a	31.47 ± 0.68a	27.48 ± 0.56a	12.04 ± 0.54a
P3	12.85 ± 0.58a	29.62 ± 0.61b	25.80 ± 0.15c	9.82 ± 0.08c
P4	13.40 ± 0.96a	30.27 ± 0.95ab	26.82 ± 0.63ab	10.89 ± 0.42b

P0:施用氮肥+钾肥,空白对照;P1:施用氮肥+钾肥+磷肥;P2:施用氮肥+钾肥+磷肥+解磷菌剂;P3:施用氮肥+钾肥+Ca₃(PO₄)₂;P4:施用氮肥+钾肥+Ca₃(PO₄)₂+解磷菌剂。同一列不同字母表示差异达到 0.05 显著水平。

溶解^[15]。本研究初步确定 *B. subtilis* JT-1 代谢过程

中可分泌柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、延胡索酸,这可能是其培养过程中 pH 降低的主要原因,也是菌株 JT-1 具有高效解磷能力的重要原因。有研究发现琥珀酸可以促使有机体内生命活动和生化过程趋于活跃,增加原质胶体的充水性,提高酶的活性,促进呼吸作用,有利于营养物质的吸收^[20]。而外源柠檬酸、苹果酸可以显著提高作物根际土壤中固态磷的溶解,促进植株体内营养元素的累积,保证植物生长发育的需要,从而提高农作物的生物量和产量^[16]。

土壤微生物在土壤养分转化与腐殖质形成过程中有着重要作用^[21]。土壤微生物可以分解植物残体,增加植物对营养元素的利用能力,从而促进植物生长,提高植物抗病性,同时还对农药或其他污染物有降解作用,改善土壤生态环境^[22]。本研究 *B. subtilis* JT-1 显著提高了土壤中微生物数量,丰富

表2 不同处理条件对盆栽小麦磷肥利用率的影响

Table 2 Phosphate utilization rate of pot-cultured wheat in various treatments

处理	施磷量 (mg/盆)	干物质 (g)		磷含量(g/kg)		每盆磷吸收量 (mg)	磷肥利用率 (%)
		秸秆	籽粒	秸秆	籽粒		
P0	0	14.92 ± 0.46d	4.21 ± 0.50c	0.75 ± 0.04b	2.58 ± 0.17b	22.05 ± 1.97d	-
P1	100.00	23.35 ± 0.60b	7.95 ± 0.61a	0.83 ± 0.07ab	2.71 ± 0.14b	40.93 ± 2.85b	18.88
P2	100.00	27.80 ± 0.87a	8.47 ± 0.76a	0.91 ± 0.11a	3.12 ± 0.25a	51.72 ± 2.06a	29.67
P3	100.00	20.96 ± 0.74c	6.74 ± 0.27b	0.63 ± 0.05c	2.18 ± 0.12c	27.90 ± 0.94c	5.85
P4	100.00	23.64 ± 0.79b	8.01 ± 0.39a	0.79 ± 0.10ab	2.85 ± 0.22ab	41.50 ± 1.82b	19.45

处理 P0~P5 见表 1 注。同一列不同字母表示差异达到 0.05 显著水平。

了土壤微生物种类,而土壤中微生物数量和种类直接反映了土壤活力^[23]。土壤微生物种类越多、数量越大表明土壤活力越高。因此施用解磷菌 JT-1 可改善土壤微生态结构,提高土壤活力,有利于植物生长。在现代农业体系中,改良土壤微生物生态对缓解化肥滥施导致的土壤板结也具有积极的作用^[24]。

本研究盆栽小麦试验结果表明,解磷菌 *B. subtilis* JT-1 作为生物菌肥,施用后不仅能提高植物对磷的利用率,而且使农作物增产,因此开发该解磷菌剂具有重要的理论意义与应用价值。

参考文献:

- [1] 邵玉芳,樊明寿,乌恩,等. 植物根际解磷细菌与植物生长发育[J]. 中国农学通报,2007,23(4):241-244.
- [2] 邵春花,王岗,董云中,等. 解磷菌剂盆栽及大田施用效果[J]. 山西农业科学,2003,31(3):40-43.
- [3] 李剑峰,师尚礼,张淑卿,等. 解磷微生物肥料研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报,2010,7(1):1-5.
- [4] 李丽丽,郎敬,杨洪一,等. 大豆根际解磷菌的鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):363-365.
- [5] 易艳梅,黄为一. 不同生态区土壤溶磷微生物的分布特征及影响因素[J]. 生态与农村环境学报,2010,26(5):448-453.
- [6] 王莉晶,高晓蓉,孙嘉怡,等. 土壤解磷微生物作用机理及解磷菌肥对作物生长的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(14):5948-5950.
- [7] 李学平,刘萍. 盐碱化土壤中 1 株耐盐解磷放线菌的生物学特性[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):363-365.
- [8] 杨艳菊,王改兰,张海鹏,等. 解磷微生物的研究现状及在农业上的应用[J]. 湖南农业科学,2012,11(6):23-25.
- [9] SPERBER J I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil[J]. Crop & Pasture Science, 1958, 9(6):778-781.
- [10] 李爱荣,安德荣. 两株生防荧光假单胞杆菌的室内筛选试验[J]. 微生物学杂志,2003,23(4):11-13.
- [11] 张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有效磷含量测定值的影响因素分析[J]. 安徽农业科学,2008,36(12):4822-4823.
- [12] CHEN Y, FAN J B, DU L, et al. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 84:235-244.
- [13] 陆海飞,郑金伟,余喜初,等. 长期无机有机肥配施对红壤性水稻土微生物群落多样性及酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2015,21(3):632-643.
- [14] DU W, ZHOU J, JIANG P, et al. Effects of *Beauveria bassiana* and acephate on enzyme activities and microbial diversity in paddy soil[J]. Plant Soil & Environment, 2013, 59(12):562-567.
- [15] 何玉龙,周青平. 解磷微生物研究进展[J]. 青海畜牧兽医杂志,2012,42(2):36-38.
- [16] 余贤美,王义,沈奇宾,等. 解磷细菌 PSB3 的筛选及拮抗作用的研究[J]. 微生物学通报,2008,35(9):1398-1403.
- [17] 戴沈艳,申卫收,贺云举,等. 一株高效解磷细菌的筛选及其在红壤性水稻土中的施用效果[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(5):678-683.
- [18] 陈令,蔡燕飞,吴荣辉,等. 枯草芽孢杆菌 HL-1 解磷发酵条件的优化[J]. 广东农业科学,2014,41(13):71-76.
- [19] 麻瑞阳,张爱民,惠小双,等. 高效解磷解钾菌 NX-11 菌株的分离筛选、鉴定及最佳培养条件的确定[J]. 华北农学报,2013,28(2):202-208.
- [20] 曾广骥. 琥珀酸对作物生育和产量的影响研究初报[J]. 东北农业大学学报,1963(3):89-94.
- [21] 庄岩,吴凤芝. 不同农艺措施对土壤微生物的影响研究进展[J]. 东北农业大学学报,2008,39(6):136-140.
- [22] 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法[J]. 农业环境科学学报,1997,16(6):252-256.
- [23] 李仲强,谭周进,夏海鳌. 耕作制度对土壤微生物区系的影响[J]. 湖南农业科学,2001(2):24-25.
- [24] CHEN Y P, REKHA P D, ARUN A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology, 2006,34(1):33-41.

(责任编辑:张震林)