

林标声,汪丽芳,张凯丽,等. 巨菌草内生固氮菌与解磷菌互作效应及其混合菌肥制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):281-283.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.065

# 巨菌草内生固氮菌与解磷菌互作效应 及其混合菌肥制备

林标声<sup>1,2</sup>,汪丽芳<sup>1</sup>,张凯丽<sup>1</sup>,王泽辉<sup>2</sup>,林占燊<sup>2,3</sup>

(1. 龙岩学院生命科学学院,福建龙岩 364012; 2. 福建农林大学生命科学学院,福建福州 350002;

3. 国家菌草工程技术研究中心,福建福州 350002)

**摘要:**拟研究巨菌草内生固氮菌变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)与解磷菌胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)的相互作用,将以上2种菌分别纯培养和混合培养,测定其菌体数量、全氮含量和溶磷量,制备变栖克雷伯氏菌单菌株固氮菌肥和多菌株固氮菌肥,并研究2种菌肥对玉米盆栽的促生作用。结果表明,与纯培养相比,2种菌混合培养时全氮量和固氮菌数均有不同程度的增长,而溶磷量和解磷菌数较纯培养时有所下降;当按1:1比例接种时,混合培养的协同作用最好;所制备的2种菌的混合菌肥符合国家行业相关标准,其有效活菌数、有效期和对玉米盆栽的促生性能均优于单菌株固氮菌肥。因此,多菌株复合菌肥具有更好的应用前景。

**关键词:**巨菌草;固氮菌 *Klebsiella variicola*;解磷菌 *Bacillus mucilaginosus*;互作效应;混合菌肥

**中图分类号:**S144.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)13-0281-03

生物固氮菌肥近年来在小麦、玉米、水稻等农作物种植中已开始被广泛使用,相对于传统化学氮肥,微生物固氮菌肥效率高、污染小,是一种环境友好型生物肥料,对改良土壤环境、提高作物产量均有重要的经济效益<sup>[1]</sup>。固氮菌肥有仅含固氮菌的单菌株制剂和固氮菌与解磷菌、解钾菌联合的多菌株制剂。相关试验结果表明,无论是单菌株制剂还是多菌株制剂,均对作物生长有一定的促进作用,但多菌株制剂的施用效果一般要强于单菌株制剂。原因可能是多菌株制剂中不同类型的微生物可以互相提供生长基质和养分,如一些固氮菌对解磷细菌的解磷作用也十分有利,而一些解磷菌生理代谢物质能促进固氮菌的生长<sup>[2]</sup>。目前所报道的固氮菌肥多采用联合固氮菌,如棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)、圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)等,但关于变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)固氮菌肥的报道较少<sup>[3]</sup>。此外,多年来研究者对固氮菌、解磷菌混合菌肥的应用效果说法不一,存在较大争议,需要进一步探讨<sup>[4-5]</sup>。因此,本研究以从巨菌草中分离得到的主要固氮菌群变栖克雷伯氏菌为固氮菌株,选择适宜的解磷菌混合培养,研究两者间的相互作用,并据此制备固氮菌、解磷菌混合菌肥,研究对作物的促生作用,以期今后微生物固氮菌肥的规模化生产和应用提供依据,使固氮菌肥在农业生产上实现“以氮促磷、以磷增氮”的良好效果。

收稿日期:2017-10-19

基金项目:福建省大学生创新创业训练计划(编号:G201711312010);菌草生态产业协同创新攻关课题(编号:JCXTGG01)。

作者简介:林标声(1980—),男,福建连城人,博士研究生,副教授,主要从事微生物学研究。E-mail:150391768@qq.com。

通信作者:林占燊,教授,博士生导师,主要从事菌草技术研究。E-mail:lxjuncao@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与玉米种子

固氮菌:变栖克雷伯氏菌,分离自巨菌草成熟期根部,由笔者所在实验室保存。解磷菌:胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*),对无机磷有较强的分解能力,由笔者所在实验室保存。玉米种子品种:仲玉988,从当地市场购买。菌肥配制原料:巨菌草,选用拔节期或成熟期的茎、叶部分,粉碎后低温烘干,过100目筛;菌草食(药)用菌菌糟,选用无木屑,仅用菌草栽培的食(药)用菌菌糟,低温烘干、粉碎,过100目筛;营养液,配方为红糖3~5 g、硫酸镁0.05~0.15 g、过磷酸钙1~2 g、水100 mL。

### 1.2 培养基

Ashby 无氮培养基配方:甘露醇10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L,  $\text{NaCl}$  0.2 g/L,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCO}_3$  5.0 g/L, pH 值7.0~7.2;磷细菌培养的有机磷培养基配方:葡萄糖10 g,硫酸铵0.5 g/L,酵母浸粉0.5 g/L,氯化钠0.3 g/L,氯化钾0.3 g/L,硫酸镁0.3 g/L,硫酸亚铁0.03 g/L,硫酸锰0.03 g/L,卵磷脂0.2 g/L,碳酸钙1.0 g/L, pH 值7.0~7.2,固体平板添加琼脂20 g/L;磷细菌培养的无机磷培养基配方:葡萄糖10 g/L,磷酸钙5 g/L,硫酸铵0.5 g/L,酵母浸粉0.5 g/L,氯化钠0.3 g/L,氯化钾0.3 g/L,硫酸镁0.3 g/L,硫酸亚铁0.03 g/L,硫酸锰0.03 g/L, pH 值7.0~7.2,固体平板添加琼脂20 g/L;固氮菌、接磷细菌混合培养的无氮培养基配方:蔗糖7.5 g/L,磷酸二氢钠2.0 g/L,硫酸镁0.5 g/L,氯化钠0.5 g/L,碳酸钙0.1 g/L,氯化铁0.005 g/L,磷灰石2.0 g/L, pH 值7.0~7.2;LB培养基配方:胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,  $\text{NaCl}$  10 g/L, pH 值7.0~7.2。

1.3 方法

1.3.1 巨菌草内生固氮菌变栖克雷伯氏菌解磷能力判定  
将变栖克雷伯氏菌在无氮液体培养基中培养至对数生长期的菌液进行梯度稀释后,分别涂布到有机磷和无机磷固体平板中,测定变栖克雷伯氏菌单菌落在 2 种培养基中的溶磷圈直径(mm);另取对数生长期的菌液,按 1% 的量分别接入有机磷、无机磷液体培养基中,于 30 ℃、150 ~ 180 r/min 振荡培养至对数生长期,测定 2 种培养基中的溶磷量(μg/mL)。分析变栖克雷伯氏菌的解磷能力,并以此为依据选择适合的解磷菌混合培养。溶磷量的测定采用钼酸铵比色法<sup>[6]</sup>。

1.3.2 变栖克雷伯氏菌与所选解磷菌的互作研究 (1)单菌培养:将变栖克雷伯氏菌与解磷菌分别接种至无氮液体培养基中,于 30 ℃、150 ~ 180 r/min 振荡培养至对数生长期,取一定体积的培养液,消煮测定全氮含量;另取适量培养液于 4 000 r/min 离心 8 ~ 10 min,取上清,测其溶磷量;同时采用稀释涂平板法分别测定各培养液中变栖克雷伯氏菌和解磷菌的数量。全氮含量测定采用凯氏定氮法<sup>[7]</sup>,溶磷量的测定采用钼酸铵比色法。(2)混合培养:将纯培养至对数生长期的变栖克雷伯氏菌与解磷菌菌悬液分别按体积比 1 : 0.5、1 : 1、0.5 : 1 3 种比例接种到 100 mL 无氮液体培养基中(培养瓶容量 250 mL),于 30 ℃、150 ~ 180 r/min 振荡培养至对数生长期,按纯培养方法计算全氮含量、溶磷量和菌体数量,选择最优比例用以制备混合菌肥。

1.3.3 变栖克雷伯氏菌单菌菌肥和混合菌肥的制备 为了提高变栖克雷伯氏菌的存活率,本试验采用巨菌草作为载体制备固氮菌肥,菌肥菌株的分离和载体均来自同一物质。将活化后的变栖克雷伯氏菌和上述试验选择的最优比例的混合菌液分别接种到 100 mL LB 液体培养基中(培养瓶容量 250 mL),于 30 ℃、150 ~ 180 r/min 下振荡培养至对数生长期。分别取 150 ~ 200 mL 菌液和 650 ~ 750 g 巨菌草、250 ~ 350 g 菌草食(药)用菌菌槽和 100 ~ 150 mL 营养液混合装入带呼吸阀的聚乙烯薄膜发酵袋中,在 25 ~ 32 ℃ 下发酵 5 ~ 10 d,若发酵物料明显变软、颜色变深,则发酵结束,按 NY 411—2000《固氮菌肥料》检测制备的单菌株制剂和多菌株制剂<sup>[8]</sup>。

1.3.4 变栖克雷伯氏菌单菌和混合菌肥的肥效试验 将所制备的变栖克雷伯氏菌单菌株和多菌株制剂分别进行玉米盆栽的肥效试验。共分为 4 组,分别为对照组 1(仅为普通泥土)、对照组 2(普通泥土加同等比例的菌草、菌槽,不含混合菌液)、试验组 1(普通泥土加 5% 固氮菌单菌株制剂)、试验组 2(普通泥土加 5% 多菌株制剂)。挑选刚冒牙尖、大小基

本一致的玉米种子,播种于塑料杯中,每杯播种 1 粒,每组播种 20 杯,培养 10 ~ 15 d,统计各组玉米出苗的时间、出苗率、根长和株高,对比 2 种菌肥肥效<sup>[9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 变栖克雷伯氏菌解磷能力的测定

如表 1 所示,变栖克雷伯氏菌在有机磷培养基中的溶磷圈直径和溶磷量均明显高于无机磷培养基,表明变栖克雷伯氏菌具有较强的降解有机磷的能力,但其降解无机磷的能力较弱。因此,选择笔者所在实验室保存的对无机磷具有较强降解能力的胶质芽孢杆菌与其混合培养,以弥补变栖克雷伯氏菌无机磷解磷能力的不足。由表 1 还可以看出,胶质芽孢杆菌不仅具有较强的降解无机磷的能力,还具有一定降解有机磷的能力。

表 1 变栖克雷伯氏菌解磷能力测定结果

菌株	溶磷圈直径(mm)		溶磷量(μg/mL)	
	无机磷培养基	有机磷培养基	无机磷培养基	有机磷培养基
变栖克雷伯氏菌	0.6±0.1	12.8±2.3	2.3±0.2	90.4±1.9
胶质芽孢杆菌	26.3±4.5	5.6±0.3	223.5±6.3	16.5±0.6

2.2 变栖克雷伯氏菌与胶质芽孢杆菌的互作研究

由表 2 可知,未接种的无氮培养基对磷有一定的溶解作用;在变栖克雷伯氏菌纯培养体系中,氮含量增加,溶磷量减少,表明变栖克雷伯氏菌具有固氮能力,但解磷能力较差;在胶质芽孢杆菌纯培养体系中,溶磷量增加,同时产生了少量氮,表明胶质芽孢杆菌解磷能力较强,也具有一定的固氮能力。与变栖克雷伯氏菌和胶质芽孢杆菌纯培养体系相比,2 种菌按不同比例接种的混合培养体系的全氮含量和固氮菌数均有不同程度的增长,而溶磷量和解磷菌数有一定的下降。结果表明,在混合培养体系中,胶质芽孢杆菌可能分泌了某种代谢产物对变栖克雷伯氏菌生长具有促进作用,使固氮菌数量增多,全氮含量增加;而变栖克雷伯氏菌的代谢产物可能对胶质芽孢杆菌有一定抑制作用,加上混合培养体系中对营养物质的竞争造成了胶质芽孢杆菌数量减少,溶磷量也随之减少。此外,变栖克雷伯氏菌和胶质芽孢杆菌的大量生长,需要利用部分可溶性磷来构建细胞成分,这也造成胶质芽孢杆菌数量降低。2 种菌不同比例的接种试验表明,当变栖克雷伯氏菌和胶质芽孢杆菌接种比例为 1 : 1 时,体系中固氮菌数和全氮含量最高,在此比例下,体系中解磷菌数量和溶磷量较高,因此综合分析后,选择变栖克雷伯氏菌与胶质芽孢杆菌最优接种比例为 1 : 1。

表 2 变栖克雷伯氏菌与胶质芽孢杆菌的相互作用

体系	全氮含量 (μg/mL)	溶磷量 (μg/mL)	固氮菌数 (×10 <sup>8</sup> CFU/g)	解磷菌数 (×10 <sup>8</sup> CFU/g)
CK	0	110.9±2.6	0	0
变栖克雷伯氏菌纯培养	3.3±0.4	82.9±1.3	2.4±0.2	0
胶质芽孢杆菌纯培养	1.2±0.3	189.6±6.3	0	38.6±0.9
2 种菌混合培养(1 : 0.5)	3.8±0.2	138.2±1.8	2.7±0.3	23.4±0.6
2 种菌混合培养(1 : 1)	4.5±0.4	151.3±1.2	2.8±0.3	27.3±0.8
2 种菌混合培养(0.5 : 1)	3.5±0.1	163.6±1.3	2.6±0.2	32.6±1.4

2.3 变栖克雷伯氏菌单菌株制剂和多菌株制剂的性能测定

表 3 结果表明:变栖克雷伯氏菌单菌株制剂和多菌株制剂各性能指标均符合 NY 411—2000《固氮菌肥料》。但多菌株制剂有效活菌数更多、杂菌率更低、有机质含量更高、保存

有效期更长,这可能是由于多菌株制剂含有胶质芽孢杆菌,其生长速度更快,使总有效活菌数更高,有机质含量增加,其他杂菌更不易生长,从而延长了保质期。

表 3 所制备的菌肥与行业标准的比较

项目	外观、气味	水分含量 (%)	pH 值	细度 (%)	有效活菌数 (CFU/g)	杂菌率 (%)	有机质含量 (%)	有效期 (月)
单菌株制剂	棕褐色粉状,较为湿润、松散,无异臭味	34.2	6.83	10.2	$4.2 \times 10^8$	12.9	31.2	6
多菌株制剂	黑褐色粉状,湿润、松散,无异臭味	34.9	6.76	10.3	$7.6 \times 10^8$	3.2	43.6	10
NY 411—2000 《固氮菌肥料》	黑褐色或褐色粉状,湿润、松散,无异臭味	25.0~35.0	6.0~7.5	20	$1.0 \times 10^8$	15.0		6

注:细度指过孔径为 0.18 mm 标准筛的筛余物所占比例。

2.4 变栖克雷伯氏菌单菌株制剂和多菌株制剂的肥效试验

表 4 结果表明,与对照组相比,2 种菌肥对玉米均有一定的促生效果,但多菌株制剂组(试验组 2)的促生效果明显优于单菌株制剂组(试验组 1),其出苗时间减少了 8.93%,出苗率、根长增量、株高增量分别提高了 11.11%、16.92%、28.77%。多菌株制剂中解磷菌的添加对作物的生长起到了一定促生作用,这可能是由于解磷菌的添加有利于固氮菌生长和增加全氮含量,从而促进作物生长,这与“2.2”节的试验结果一致。

表 4 所制备的单菌株和多菌株制剂对玉米的促生试验结果

组别	出苗时间 (d)	出苗率 (%)	根长增量 (cm)	株高增量 (cm)
对照组 1	8.1±0.5	70	2.5±0.3	7.1±0.6
对照组 2	6.3±0.6	85	4.7±0.4	10.2±1.0
试验组 1	5.6±0.3	90	6.5±0.5	14.6±0.8
试验组 2	5.1±0.2	100	7.6±0.4	18.8±0.6

3 结论与讨论

变栖克雷伯氏菌属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),是根系联合固氮微生物的一种<sup>[10]</sup>。笔者所在实验室前期工作已证实,变栖克雷伯氏菌在巨菌草中丰度最高、含量最为丰富,为最主要的内生固氮菌群,并已在巨菌草成熟期的根部分离得到。变栖克雷伯氏菌具有较强的固氮作用,同时也具有一定的降解有机磷、分泌吲哚乙酸(IAA)和产铁载体的能力,是固氮菌肥开发的优良种质资源<sup>[11]</sup>。但近年来,实践证明单菌株制剂的固氮菌菌肥易失活、保质期短,其生产施用受到了一定限制<sup>[12]</sup>。因此,本试验研究了变栖克雷伯氏菌与对无机磷有较强降解能力的胶质芽孢杆菌的相互作用,以期能提高变栖克雷伯氏菌固氮菌肥的总菌数,增加有效活菌数,延长有效期。试验结果表明,与 2 种菌纯培养体系相比,混合培养时体系中全氮含量和固氮菌数均有不同程度的增长,而溶磷量和解磷菌数有一定的下降;当 2 种菌按 1:1 比例接种时,混合培养的协同作用最好。试验所制备的多菌株制剂符合行业相关标准,其有效活菌数、有效期和对玉米盆栽的促生性能均优于单菌株制剂,具有更好的应用前景。

固定菌和解磷菌是微生物菌肥中常添加的 2 种微生物菌

剂,研究表明,多菌株的混合培养有利于互相提供营养,消除不利因素,发挥有益的代谢协同作用<sup>[13]</sup>。本试验结果表明,在固氮菌肥中添加解磷菌可以促进固氮菌生长,提高体系中的全氮含量,有利于作物生长,证实了多菌株制剂的促生效果确实优于单菌株制剂,多菌株复合菌肥的技术值得深入探讨和推广应用<sup>[14]</sup>。

参考文献:

[1]姜莹,周文美,危克周,等.生物固氮肥对苏麻种植的影响试验[J].贵州大学学报(自然科学版),2016,33(4):30-33.

[2]张堃.禾本科牧草根际促生菌肥(PGPR 菌肥)研制及其促生效应研究[D].兰州:甘肃农业大学,2006.

[3]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,2015,30(5):810-821.

[4]韩梅,魏冉,李丽娜,等.混合培养对菌剂固氮、解磷和解钾能力的影响[J].沈阳农业大学学报,2010,41(5):622-625.

[5]夏觅真,马忠友,曹媛媛,等.棉花根际固氮菌、解磷菌及解钾菌的相互作用[J].中国微生态学杂志,2010,22(2):102-105.

[6]张琳.钼酸铵比色法测定蔗汁中磷酸盐含量试验方法的改进[J].甘蔗糖业,2016(5):198-201.

[7]胡佳频,汤鹏,易浪波,等.钾长石矿区土壤固氮菌的多样性分析[J].中国微生态学杂志,2015,27(10):1127-1130.

[8]毛露甜,谢山麟玉,黄雁,等.固氮菌肥在几种蔬菜上的肥效试验[J].惠州学院学报,2014,34(6):23-27.

[9]谭志远,袁涛,顾文杰,等.岑溪药用野生稻高效内生固氮菌分离及促生特性[J].微生物学通报,2015,42(8):1482-1491.

[10]赵明富,李梦娇,张芬芬,等.变栖克雷伯氏菌在石斛体内的定殖动态及其对石斛黑斑病的防效试验[J].西南林业大学学报,2015,35(3):14-19.

[11]魏春燕,邢永秀,林丽,等.接种变栖克雷伯氏菌 DX120E 对不同甘蔗品种的促生效应[J].应用生态学报,2014,25(7):2085-2092.

[12]姜明.圆褐固氮菌、巨大芽孢杆菌复合菌肥的制作及应用效果[J].安徽农业科学,2010,38(28):15705-15706.

[13]常惠萍祝凌云,姚丽娟,等.小麦根际固氮菌、解磷菌及解钾菌的互作效应[J].中国土壤与肥料,2008(4):57-59.

[14]陈娟丽,师尚礼,祁娟.复合菌肥与化肥配施对高寒地区土壤微生物数量和土壤酶活性的影响[J].草原与草坪,2016,36(1):7-13.