

## 盐碱土壤修复菌剂的微生物筛选

张咪, 赵文静, 赵亚男, 王琦, 张丽霞

### 引用本文:

张咪, 赵文静, 赵亚男, 王琦, 张丽霞. 盐碱土壤修复菌剂的微生物筛选[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2622-2628.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1158>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 三种环境材料及其复合施用对盐碱化土壤的改良效果研究

金梦野, 黄娟, 侯斌, 黄占斌

农业环境科学学报. 2020, 39(1): 118-124 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0880>

#### 不同土壤改良剂对盐碱土壤化学性质和有机碳库的影响

冀拯宇, 周吉祥, 张贺, 郭康莉, 刘晓, 姜慧敏, 杨俊诚, 李桂花, 张建峰

农业环境科学学报. 2019, 38(8): 1759-1767 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0426>

#### 氢氧化镁铝改良滨海盐碱土机理与效果研究

田露, 赵林, 杨永奎, 乔治

农业环境科学学报. 2018, 37(10): 2220-2225 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1738>

#### 重金属耐性芽孢杆菌的筛选及其对辣椒吸收镉铅的阻控效应

杨丽, 燕传明, 贺卓, 盛下放, 何琳燕

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1086-1093 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1473>

#### 土壤微生物与有机物料对盐碱土团聚体形成的影响

杨华, 陈莎莎, 冯哲叶, 邓照亮, 李真, 王世梅

农业环境科学学报. 2017, 36(10): 2080-2085 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0379>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张咪, 赵文静, 赵亚男, 等. 盐碱土壤修复菌剂的微生物筛选[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2622-2628.

ZHANG M, ZHAO W J, ZHAO Y N, et al. Microbial screening of saline-alkali soil remediation agents[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2622-2628.



开放科学 OSID

## 盐碱土壤修复菌剂的微生物筛选

张咪<sup>1</sup>, 赵文静<sup>1</sup>, 赵亚男<sup>2</sup>, 王琦<sup>2</sup>, 张丽霞<sup>1\*</sup>

(1. 中农绿康(北京)生物技术有限公司, 北京 102101; 2. 中国农业大学, 北京 100193)

**摘要:**为盐碱土壤修复菌剂提供菌种资源,本研究从盐碱地植物根际土壤中筛选具有促生耐盐碱、产胞外多糖、解磷、解钾等能力的芽孢杆菌,并通过形态、生理生化、分子鉴定确定菌株种类,通过向日葵盐碱地种植试验,考察耐盐碱芽孢杆菌发酵液对植物生长状况和土壤理化性质的影响。本研究从7株促生芽孢杆菌中筛选出两株耐盐碱、产胞外多糖、解磷、解钾的菌株B25、B43,经鉴定为巨大芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。在向日葵盐碱土壤种植试验中,增施土壤修复菌剂的处理比常规施肥株高、茎粗、盘粒重、结实率、产量分别增加1.53%、8.44%、7.23%、3.40%、12.37%;土壤pH降低0.4,有机质、全氮、有效磷、速效钾含量分别增加42.48%、15.04%、41.52%、31.13%,含盐量减少1.76%。巨大芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌具有较强的胞外多糖产生能力,在盐碱土壤中,促进向日葵生长和改良土壤的效果显著,可用于盐碱土壤改良菌剂的研制。

**关键词:**促生芽孢杆菌;盐碱土壤修复;胞外多糖;解磷;解钾

中图分类号:S156.4 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)12-2622-07 doi:10.11654/jaes.2022-1158

### Microbial screening of saline-alkali soil remediation agents

ZHANG Mi<sup>1</sup>, ZHAO Wenjing<sup>1</sup>, ZHAO Yanan<sup>2</sup>, WANG Qi<sup>2</sup>, ZHANG Lixia<sup>1\*</sup>

(1. Sino Green Agri-Biotech Co. Ltd, Beijing 102101, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In this study, salt and alkali resistant plant growth promoting rhizobacteria were screened to provide high quality strains for the restoration of saline-alkali soils. The rhizosphere of saline-alkali plants was sampled to screen the strains with growth-promoting effect, saline-alkaline resistivity, ability to produce exopolysaccharides, and solubilize phosphate and potassium. The final strains were identified based on their morphology, physiology, and biochemistry. A sunflower experiment was carried out in saline-alkali soils to investigate whether the screened strains were effective. Plant growth and soil indexes were collected as indicators. B25 and B43 were screened and identified as *Bacillus megaterium* de Bary and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively. In the sunflower experiment, the plant height, stem diameter, grain weight, seed setting rate, and yield of treatment group were higher than the control group by 1.53%, 8.44%, 7.23%, 3.40%, and 12.37%, respectively. Soil pH was found to be lower by 0.4. The content of the organic matter, total nitrogen, and the available phosphorus and potassium in the soil were reported to be higher by 42.48%, 15.04%, 41.52%, and 31.13%, respectively. Salt content of the treatment group was lower by 1.76%. In conclusion, B25 and B43 have strong ability to produce exopolysaccharides, can promote sunflower growth, and repair saline-alkali soils, while also acting as good quality strains for saline-alkali soil remediation.

**Keywords:** growth-promoting bacillus; saline-alkali soil remediation; exopolysaccharide; phosphate solubilizing; potassium solubilizing

收稿日期:2022-11-12 录用日期:2022-12-06

作者简介:张咪(1991—),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事植物保护研究。E-mail:907377802@qq.com

\*通信作者:张丽霞 E-mail:Zhanglixia6240@163.com

基金项目:北京优秀青年工程师创新工作室项目

Project supported: Beijing Excellent Young Engineer Innovation Studio Project

目前全世界盐碱化土壤面积已达10亿 $\text{hm}^2$ ,我国盐碱化和次生盐碱化土壤总面积约3.5亿 $\text{hm}^2$ <sup>[1-3]</sup>,其中可以改造利用的盐碱土壤面积约1300万 $\text{hm}^2$ <sup>[4]</sup>。盐碱地的改良是增加耕地面积、修复耕地生态的重要突破口,治理潜力巨大<sup>[5]</sup>。相比于化学改良和物理改良,生物修复具有节约能源、高效经济、持久性强、改良效果稳定等优点,是盐碱土改良的重要研究方向<sup>[6]</sup>。

植物根际促生菌(PGPR)被越来越多地用于盐碱土壤改良的研究。PGPR可以通过分泌植物生长激素吲哚-3-乙酸(IAA),促进植株生长<sup>[7]</sup>;能够产生胞外多糖,与土壤颗粒形成土壤团聚体,增加土壤的透气性,改善土壤结构<sup>[8-11]</sup>;还能够解磷解钾,提高土壤养分利用率<sup>[8,10]</sup>。其中,芽孢杆菌生长快、营养需求简单,能产生抗逆性极强的芽孢,这使得芽孢杆菌制剂批量生产工艺简单,发酵生产成本较低,制剂施用方便且产品储存期长,是一种理想的盐碱土壤修复微生物制剂<sup>[12]</sup>。

本研究从盐碱地植物根际土壤分离筛选出促生芽孢杆菌,通过液体发酵和平板活性测试筛选鉴定出具有耐盐碱、解磷、解钾、产胞外多糖的菌株,并验证其改善盐碱土壤理化性质、促进向日葵生长等效果。本研究期望为盐碱土壤修复菌剂的研制提供优质菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 收集土壤样品

土壤样品取自巴彦淖尔市农牧业科学研究院干召庙试验基地,选取长势良好的向日葵,挖出向日葵根,轻微振动,以去掉根上松散的土壤,用小刷子轻轻刷下牢固粘附在根表面的土壤,4℃保存。

### 1.2 主要培养基

细菌培养采用NA营养肉汤培养基:牛肉膏3g,氯化钠5g,蛋白胨10g,水1000mL,pH7.0。

细菌培养采用LB固体培养基:胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,氯化钠10g,琼脂20g,水1000mL,pH7.0。

细菌平板培养采用GNA培养基:葡萄糖10g,蛋白胨10g,牛肉浸膏3g,酵母浸膏1g,琼脂20g,水1000mL,pH7.0。

解磷菌的筛选采用无机磷培养基:葡萄糖10g,硫酸铵0.5g,酵母粉0.5g,七水合硫酸镁0.3g,氯化钠0.3g,氯化钾0.3g,七水合硫酸铁0.03g,硫酸锰

0.03g,磷酸钙10g,水1000mL,pH7.2。

解钾菌筛选采用的培养基:蔗糖5g,葡萄糖5g,硫酸铵0.5g,酵母粉0.5g,七水合硫酸镁0.5g,磷酸氢二钠2.0g,七水合硫酸铁0.03g,七水合硫酸锰0.03g,钾长石2g,水1000mL,pH7.2。

耐盐耐碱菌的筛选采用营养肉汤培养基,在其基础上调整培养基的含盐量为0.5%、1%、3%、5%、7%、9%、11%、13%、15%;调整营养肉汤培养基的pH分别为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 芽孢杆菌分离培养

取植物根际土壤样品10g,放入90mL无菌水中,于30℃、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡30min制成土壤液,振荡混匀后进行梯度稀释,将装有 $10^{-4}$ ~ $10^{-2}$ 稀释液的离心管封好放到水浴锅中,80℃、20min以杀死绝大部分非芽孢杆菌。水浴后将各个梯度的稀释液吸取100 $\mu\text{L}$ 分别涂布于LB培养基上,每个处理重复3次,37℃培养。根据观察到的菌落形态挑取不同的单菌落,纯化后将菌液与30%的甘油1:1混合后保存于菌种管,放入超低温冰箱中。

#### 1.3.2 产IAA芽孢杆菌的筛选

将分离纯化后的细菌分别接种于含L-色氨酸( $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的LB液体培养基中,于30℃、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中黑暗振荡培养1d,取50 $\mu\text{L}$ 菌悬液滴于白色陶瓷板上,加上50 $\mu\text{L}$ Salkowski比色液(50mL35% $\text{HClO}_4$ +1mL0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{FeCl}_3$ )。并加入50 $\mu\text{L}$ 未接菌的液体培养基与等体积的混合溶液为对照。将充分混合的白色陶瓷板放置于室温避光处,30min后观察结果,颜色变红者表示能够产IAA。

#### 1.3.3 耐盐碱能力测定

将菌株分别接种到含氯化钠0.5%(对照),1%、3%、5%、7%、9%、11%、13%、15%、17%的NA固体培养基上,划线,35℃培养3d,观察生长情况,以确定细菌的耐盐程度。

将对数期的菌液以2%的接种量接种于pH为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12的盛有5mL营养肉汤培养基的50mL试管中,32℃、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养24h,分别测取 $\text{OD}_{600}$ 值。

#### 1.3.4 解磷能力测定

在盛有10mL无机磷培养基的50mL试管中,接入2%的 $1\times 10^8$ CFU菌液,32℃、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养3d。用离心机12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,5min分离菌液,取上清液待测。用钼锑抗比色法测定上清液中的可溶性

无机磷含量。

### 1.3.5 解钾能力测定

在盛有 10 mL 解钾培养基的 50 mL 试管中,接入 2% 的  $1 \times 10^8$  CFU,  $32^\circ\text{C}$ ,  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 3 d 后,用离心机  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min 分离菌液,取上清液待测。用原子吸收分光光度法测钾离子含量。

### 1.3.6 菌株产胞外多糖能力

产胞外多糖标注曲线确定:葡萄糖 0.100 g,加蒸馏水溶解并定容至 100 mL,精密移取 10 mL,再次定容至 100 mL,此时终浓度为  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密吸取葡萄糖标准溶液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50、2.00 mL 于 10 mL 具塞试管内,补充水至 2.00 mL,另取一支空管加入 2.00 mL 蒸馏水作为对照。每管各精密加入  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯酚溶液(新鲜配制)1 mL,浓硫酸 5 mL,混匀,放置 5 min,  $60^\circ\text{C}$  水浴加热显色 30 min,冷水浴冷却 15 min 至室温;测定  $\text{OD}_{490}$ ,以葡萄糖含量为横坐标,以  $\text{OD}_{490}$  为纵坐标,绘制标准曲线,见图 1。

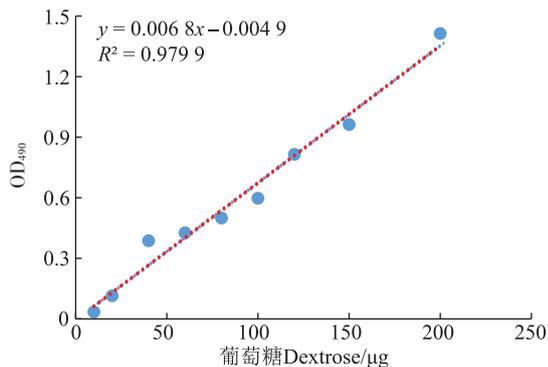


图1 胞外多糖含量标准曲线

Figure 1 Standard curve of exopolysaccharide content

将芽孢杆菌接种至 LB 培养基中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 24 h,按照苯酚硫酸法结合标注曲线,比较测定 7 株菌的胞外多糖产生能力。取 4 mL 菌液,加入 2 mL 质量分数 30% 三氯乙酸(TCA),  $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 除去蛋白。收集上清液,加入 3 倍体积的无水冷乙醇,沉淀过夜。  $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,收集沉淀物,并用蒸馏水溶解,即为胞外多糖水溶液。测定吸光值  $\text{OD}_{490}$ 。根据标准曲线,折算出胞外多糖的含量<sup>[13]</sup>。

### 1.3.7 菌株鉴定

#### (1) 形态特征

将终筛芽孢杆菌接种到 GNA 培养基上,  $37^\circ\text{C}$  倒置培养 24 h,考察其菌落形态。采用革兰氏染色法,用显微镜查看其菌体形态<sup>[14]</sup>。

#### (2) 生理生化特性

将终筛芽孢杆菌在 GNA 培养基进一步培养后,根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>中的生理生化检测方法,对该菌进行生理生化特性测定。

#### (3) 分子鉴定

将终筛两株芽孢杆菌进行基因组 DNA 的提取,并分别用引物 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') 和 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 片段基因扩增,根据需要结合 gyrA 片段基因引物 gyrA-42F (5' - CAGTCAGGAAATGCG-TACGTCCTT-3') 和 gyrA-1066R (5' - CAAGGTAAT-GCTCCAGGCATTGCT-3') 进一步鉴定到种,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,将所获序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索同源序列进行比对,通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,结合形态学和生理生化特征确定菌株种属。

### 1.3.8 对盐碱土壤的改良修复及作物促生作用

将最终筛选的两株菌接种到 LB 液体培养基中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养,菌含量  $\geq 10 \times 10^8$  CFU  $\cdot \text{mL}^{-1}$  停止发酵,等量混合,获得微生物发酵菌液,作为土壤修复菌剂使用。

于 2021 年 4 月—10 月在巴彦淖尔市农牧业科学研究院千亩试验基地进行,供试作物为向日葵,种植前试验地 pH 为 8.7。试验共设置两个处理,CK: 常规施肥,基肥施二铵  $375 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 50% 硫酸钾  $75 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ ; T1: 常规施肥的基础上,施基肥时加入土壤修复菌剂  $300 \text{ L} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。

在收获时,测量向日葵株高、茎粗、盘粒重、结实率、产量。检测土壤 pH、有机质、全氮、有效磷、速效钾、可溶性盐含量。pH 使用 PB-10 型 pH 计测定;有机质采用重铬酸钾容量法测定;全氮采用凯氏法测定;土壤有效磷采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定;土壤速效钾通过火焰光度计法测定;土壤可溶性盐含量采用电导法测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产 IAA 芽孢杆菌的筛选

经分离培养共筛选出 63 株芽孢杆菌,经过 Salkowski 比色法测试,筛选出 7 株产 IAA 芽孢杆菌,编号分别是 B18、B21、B25、B43、B56、B58、B60。

### 2.2 促生芽孢杆菌耐盐性

平板耐盐实验确定 7 株促生芽孢杆菌均具有良好的耐盐性,如表 1 所示,其中 B21、B25、B43、B56、B58 表现良好,最高可以承受 11% 的含盐量。B18、

B60次之,最高能够在9%含盐量的平板上生长。

### 2.3 促生芽孢杆菌耐碱性

菌株在不同pH下的生长情况不同(图2),过酸或过碱都会在一定程度上抑制细菌生长,以pH为7时的菌密度为参照判断菌株在不同pH下的生长情况,7株促生芽孢杆菌在pH 4~8的范围内均长势良好。其中B25、B43、B60的耐碱性良好,其中B25、B60最高可承受pH为11的碱性培养基,B43最高可在pH为10的碱性培养基上生长。

### 2.4 促生芽孢杆菌解磷能力

将菌体定量接入无机磷液体培养基中,经培养后,测得可溶磷的含量(表2),其中菌株B25解磷能力最强,显著高于其他菌株,可达到 $6.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,B43解磷能力次之,为 $3.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.5 促生芽孢杆菌解钾能力

用原子吸收分光光度计测定发酵液中的全钾含量,结果见图5,B43发酵液中可溶性钾离子含量最高,为 $7.82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与B25可溶性钾离子含量无显著差异,这两者都显著高于其他菌株。

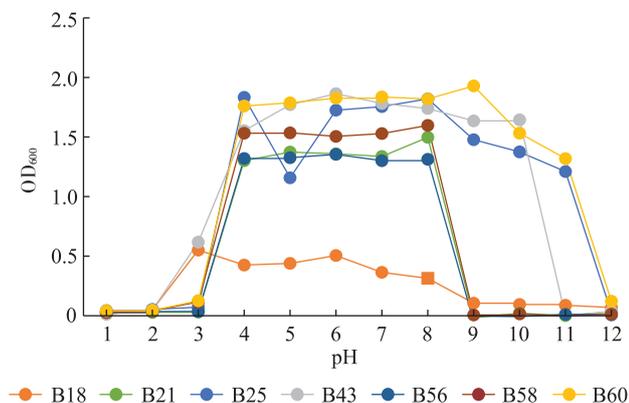


图2 菌株耐碱比较

Figure 2 Comparison of alkali resistance among the strains

### 2.6 促生芽孢杆菌产胞外多糖能力

测定菌株的胞外多糖含量,结果如图6所示,其中B25、B43两株菌分别可产 $2\ 232.22$ 、 $2\ 182.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胞外多糖,这两株菌之间无显著差异,产胞外多糖能力显著强于其他菌株( $P < 0.05$ )。

表2 菌株解磷能力比较

Table 2 Comparison of phosphate-solubilizing ability among the strains

菌株 Strain	解磷能力 Phosphate-solubilizing ability/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
B18	$1.80 \pm 0.00\text{Cc}$
B21	$0.61 \pm 0.02\text{Dd}$
B25	$6.80 \pm 0.06\text{Aa}$
B43	$3.45 \pm 0.35\text{Bb}$
B56	$0.41 \pm 0.21\text{Dd}$
B58	$1.91 \pm 0.01\text{Cc}$
B60	$0.80 \pm 0.08\text{Dd}$

注:同列不同小写和大写字母分别表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )。下同。

Note: Different lowercase and uppercase letters in the same column indicate significant differences among treatments at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  levels, respectively. The same below.

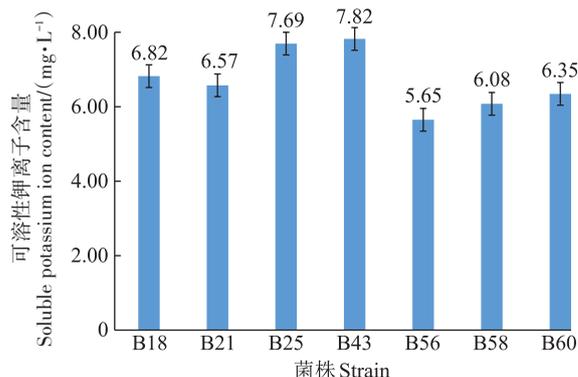


图5 可溶性钾离子含量

Figure 5 Soluble potassium ion content

表1 菌株耐盐性比较

Table 1 Comparison of salt tolerance among the strains

菌株 Strain	NA0	NA1(1%)	NA2(3%)	NA3(5%)	NA4(7%)	NA5(9%)	NA6(11%)	NA7(13%)	NA8(15%)	NA9(17%)
B18	***	***	**	**	**	*	—	—	—	—
B21	***	**	**	*	*	*	*—	—	—	—
B25	***	***	**	*	*	*	*—	—	—	—
B43	***	***	**	**	*	*	*—	—	—	—
B56	***	***	**	**	*	*	*—	—	—	—
B58	***	***	***	**	**	*	*—	—	—	—
B60	***	**	*	*	*	*—	—	—	—	—

注:\*\*\*表示菌株生长良好,\*\*表示菌株长势受到轻微限制,\*表示菌株长势明显受到限制,\*—代表有菌体生长,但生长受到严重限制,—表示菌株未在平板上生长。

Note:\*\*\* means bacteria grows well,\*\* means the growth of bacteria is slightly limited,\* means the growth of bacteria is obviously limited,\*— means the growth of bacteria is severely limited,— means bacteria do not grow.

## 2.7 鉴定 B25、B43

### 2.7.1 B25、B43形态特征

综合上述研究,最终筛选出 B25、B43 这两株具有较强耐受性及溶磷解钾能力的菌株进行鉴定。菌株 B25 在营养琼脂培养基上菌落为圆形,如图 7a 所示,开始半透明,后成乳白色,扁平内凹,随时间延长呈浅褐色。菌体如图 7b 所示,杆状,末端圆,单个或呈短链排列。革兰氏阳性,可形成芽孢中生到端生。芽孢从椭圆形到圆形不等。B43 菌落如图 7c 所示,淡黄色不透明菌落,表面粗糙,有隆起,边缘不规则,革兰氏染色呈阳性;菌体如图 7d 所示,杆状,可形成内生芽孢,呈椭圆形,两端钝圆,芽孢囊不膨大。

### 2.7.2 B25、B43生理生化特征

将 B25、B43 菌株在 LB 培养基进一步培养后,根据《伯杰细菌鉴定手册》中的生理生化检测方法,对该

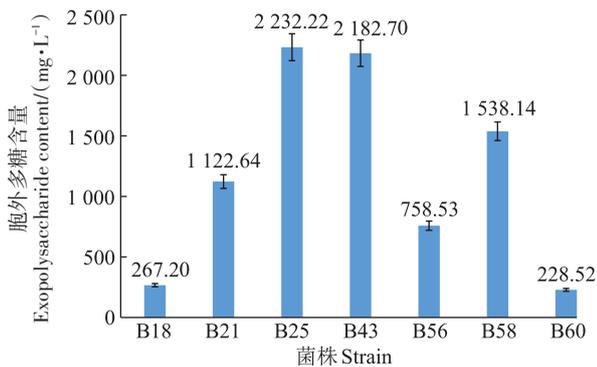


图6 菌株产胞外多糖能力比较

Figure 6 Comparison of exopolysaccharide production capacity among the strains

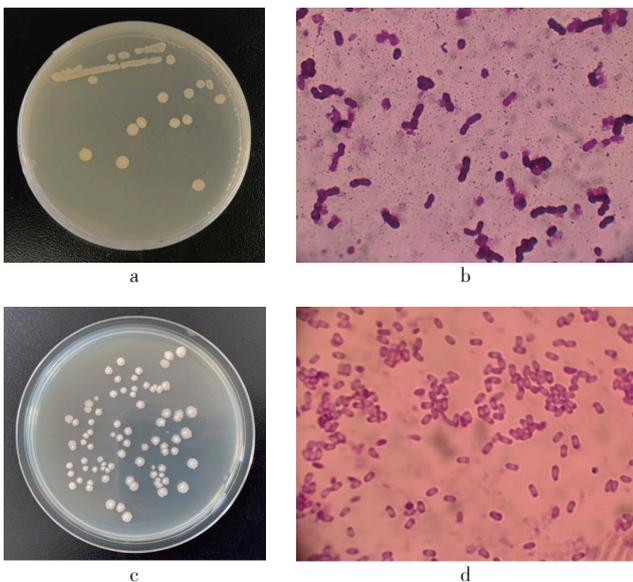


图7 B25、B43菌落与菌体形态

Figure 7 Morphology of colonies and cells of B25 and B43

菌进行生理生化特性测定,结果如表3所示。B25接触酶阳性,不能厌氧生长,乙酰甲基甲醇(V-P)反应阴性。B43 V-P试验阴性,硝酸盐还原试验阴性,苯丙氨酸脱氨酶试验、吲哚试验均为阴性。

表3 B25、B43生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical properties of B25 and B43

特征 Property	B25	B43
接触酶 Contact enzyme	+	+
厌氧生长 Anaerobic reaction	-	+
V-P反应 VP reaction	-	-
葡萄糖 Dextrose	+	+
木糖 Xylose	+	+
甘露醇 Mannose	+	+
明胶 Gelatin	+	+
淀粉 Amylum	+	+
柠檬酸盐 Citrate reaction	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	-
硝酸盐还原反应 Nitrate reduction test reaction	+	-
吲哚反应 Indole reaction	-	-
pH5.7	+	+
pH6.8	+	+
7%NaCl生长反应 7%NaCl growth reaction	+	+
55℃生长反应 55℃ growth reaction	-	-

### 2.7.3 B25、B43分子鉴定

B25菌株经PCR对16S rDNA扩增得到了一段基因序列,测序后与NCBI数据库进行Blast比对。使用MEGA 5.0软件构建的系统发育树见图8a, B25菌株与菌株 *Bacillus megaterium* IAM 13418<sup>T</sup>、*Priestia megaterium* BHS1、*Priestia megaterium* YB-8B(MT081301.1)和 *Priestia megaterium* FORT 10(MG561340.1)同源性较高,聚为同一分支。结合B25菌株的形态学特征和生理生化鉴定结果,进一步证明B25菌株为巨大芽孢杆菌。

B43菌株经PCR对16S rDNA和gyrA片段基因扩增得到序列,测序后与NCBI数据库进行Blast比对,使用MEGA 5.0软件构建的系统发育树见图8b和图8c, B43菌株与模式菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRC 15535<sup>T</sup>、*Bacillus amyloliquefaciens* MPA 1034<sup>T</sup>、*Bacillus amyloliquefaciens* BCRC 11601<sup>T</sup>和Blast比对结果 *Bacillus amyloliquefaciens* pfn41和 *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-6-3聚为同一分支,结合形态学特征和生理生化鉴定结果,进一步证明B43菌株为解淀粉芽孢杆菌。

已有研究表明,巨大芽孢杆菌具有强大的解磷功

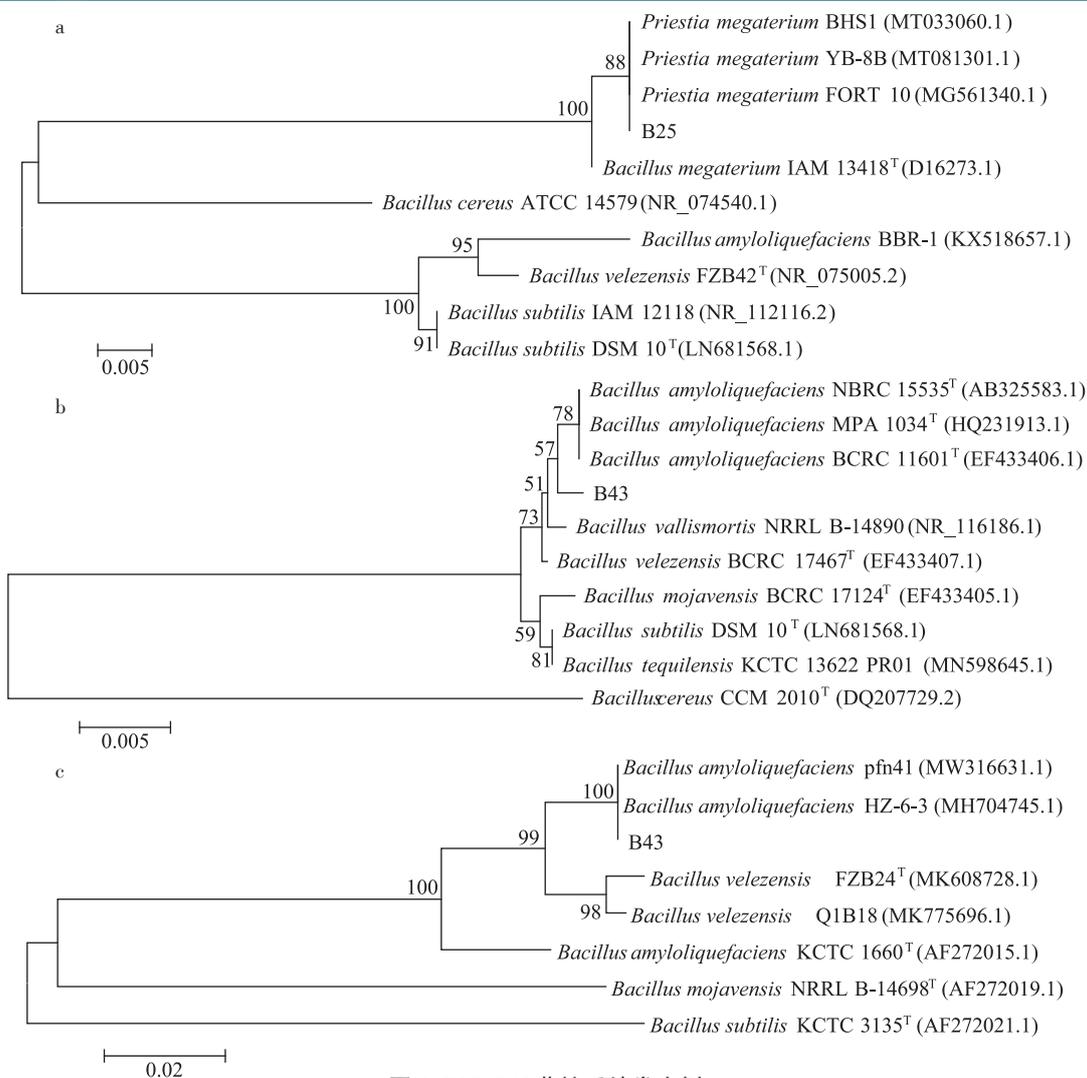


图8 B25、B43菌株系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree of B25 and B43 strain

能,产生的芽孢抗逆性强,与本实验得到的结果一致<sup>[15]</sup>。解淀粉芽孢杆菌作为一种益生菌被广泛认知,能够产生多种具有拮抗性或竞争性的物质<sup>[16]</sup>。本实验中解淀粉芽孢杆菌还表现出较强的耐盐碱性及溶解钾性。

### 2.8 土壤修复菌剂对向日葵生长指标的影响

为验证B25、B43这两株菌的效果,将其发酵液作为土壤修复菌剂进行田间试验。盐碱土壤中,增施土壤修复菌剂与常规施肥对向日葵生长指标的影响结果见表4。结果显示,增施土壤修复菌剂的处理比常规施肥株高、茎粗、盘粒重、结实率、产量分别增加1.53%、8.44%、7.23%、3.40%、12.37%。结果表明,B25、B43能够促进向日葵生长,增加其产量。

### 2.9 土壤修复菌剂对土壤理化指标的影响

盐碱土壤中,增施土壤修复菌剂与常规施肥对土

壤理化指标的影响结果见表5。结果显示,增施土壤修复菌剂的处理比常规施肥pH降低0.4,有机质、全氮、有效磷、速效钾含量分别增加42.48%、15.04%、41.52%、31.13%,含盐量减少1.76%。由此得到,B25、B43能够有效改善盐碱土壤的理化性质。

## 3 结论

本研究对土壤中筛出的7株促生菌分别进行了

表4 土壤修复菌剂对向日葵生长指标的影响

Table 4 Effects of soil remediation agent on sunflower growth indexes

处理 Treatment	株高 Height/cm	茎粗 Stem diameter/cm	盘粒重 Grain weight/g	结实率 Seeds setting/%	产量 Production/ (kg·hm <sup>-2</sup> )
CK	227.65b	35.17b	218.24b	84.82b	4 622.25b
T1	231.14a	38.14a	234.02a	87.70a	5 193.9a

表5 微生物菌剂对土壤理化指标的影响  
Table 5 Effects of soil remediation agent on soil physicochemical indexes

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter/ (g·kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total nitrogen/ (g·kg <sup>-1</sup> )	有效磷 Available phosphorus/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	速效钾 Available potassium/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	含盐量 Salt content/ (g·kg <sup>-1</sup> )
CK	8.7	16.22	1.13	14.21	271.93	3.98
T1	8.3	23.11	1.3	20.11	356.58	3.91

耐盐性、耐碱性、解磷性、解钾性、产胞外多糖能力的测定。其中,菌株B25、B43表现最为优异。经鉴定这两株菌分别为巨大芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌。由大田试验验证,以菌株B25、B43为原料的菌剂能降低土壤pH,提高土壤养分,促进向日葵生长。本研究为功能性土壤改良菌剂的研制提供菌种资源。

参考文献:

[1] WICKE B, SMEETS E, DORNBURG V, et al. Correction: The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils [J]. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(8):2669.

[2] 杨劲松,姚荣江,王相平等. 中国盐渍土研究:历程、现状与展望[J]. *土壤学报*, 2022, 59(1):10-27. YANG J S, YAO R J, WANG X P, et al. Research on salt-affected soils in China: History, status quo and prospect[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(1):10-27.

[3] 高惠敏,王相平,屈忠义,等. 不同改良剂对河套灌区土壤盐碱指标及作物产量的影响研究[J]. *土壤通报*, 2020, 51(5):1172-1179. GAO H M, WANG X P, QU Z Y, et al. Effects of different soil amendments on salinity index and crop yield in the irrigation area of Hetao[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2020, 51(5):1172-1179.

[4] 赵英,王丽,赵惠丽,等. 滨海盐碱地改良研究现状及展望[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(3):67-74. ZHAO Y, WANG L, ZHAO H L, et al. Research status and prospects of saline-alkali land amelioration in the coastal region of China[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(3):67-74.

[5] 张蓉蓉. 土壤盐碱化的危害及改良方法[J]. *现代农业科技*, 2019, 21:178-179. ZHANG R R. Harm of soil salinization and improvement methods[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*. 2019, 21:178-179.

[6] 孙雪,董永华,王娜,等. 耐盐碱促生菌的筛选及性能[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(7):1356-1364. SUN X, DONG Y H, WANG N, et al. Screening and evaluation of saline-alkali-tolerant and growth-promoting bacteria[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(7):1356-1364.

[7] 姜晓宇,高菊生,徐凤花,等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. *微生物学报*, 2013, 53(3):269-275. JIANG X Y, GAO J S, XU F H, et al. Determination of endophytic bacterial di-

versity and its ability to secrete auxin in rice seeds[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3):269-275.

[8] 姜焕焕,王通,陈娜,等. 根际促生菌提高植物抗盐碱性的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10):189-197. JIANG H H, WANG T, CHEN N, et al. Research progress in PGPR improving plant's resistance to salt and alkali[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(10):189-197.

[9] 张哲超. 耐盐碱根际促生菌与丛枝菌根真菌联合提高牧草盐碱耐受性的微生物机制研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2022:3-7. ZHANG Z C. Microbial mechanism of combined inoculation with halo-alkalitolerant rhizosphere growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi to improve the saline-alkali tolerance of herbage[D]. Hohhot:Inner Mongolia University, 2022:3-7.

[10] 李慧芬,方安然,冯海霞,等. 胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其促生改土作用[J]. *微生物学通报*, doi: 10.133441j-microbiol.China.220646. LI H F, FANG A R, FENG H X, et al. Screening and identification of extracellular polysaccharide-producing strain and the influence on soil quality and crop growth[J]. *Microbiology China*, doi:10.133441j-microbiol.China.220646.

[11] 上官王丽. 产胞外多糖细菌多样性及其对土壤团聚体形成作用的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2013:6-7. SHANGGUAN W L. The diversity of exopolysacchlvride-producing bacteria and their effects on aggregation in soils.[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013:6-7.

[12] 李双东. 防治稻瘟病芽孢杆菌的筛选及生防机制研究[D]. 北京:中国农业大学, 2015:4. LI S D. Screening of antagonistic bacillus against rice blast and study on biocontrol mechanisms[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015:4.

[13] BUCHANAN R E, GIBBONS N E, 著. 中国科学院微生物研究所, 译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京:科学出版社, 1984. BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. (8th Edition) Beijing:Science Press, 1984.

[14] 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. DONG X Z, CAI M Y. Handbook for the identification of common bacterial systems[M]. Beijing:Science Press, 2001.

[15] 郭玥琦,周丽洪,龚利娟,等. 解淀粉芽孢杆菌在农业领域的研究与应用[J]. *四川农业科技*, 2022(8):80-84, 110. GUO Y Q, ZHOU L H, GONG L J, et al. Research and application of *Bacillus amyloliquefaciens* in agriculture[J]. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 2022(8):80-84, 110.

[16] 杨晓燕,叶伟伟,魏善强,等. 一株巨大芽孢杆菌发酵培养基的优化及解磷效果研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(15):105-112. YANG X Y, YE W W, WEI S Q, et al. *Bacillus megaterium*: Fermentation medium optimization and phosphate solubilization effect[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(15):105-112.

(责任编辑:叶飞)