

# 盐碱土壤生物改良剂的制备及其效果初报

于明礼

(滨州职业学院 生物工程学院, 山东 滨州 256603)

**摘 要:**以耐盐碱的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)菌株 X7 和番茄为试验材料,对菌株 X7 的发酵条件和不同含菌量生物改良剂对盐碱土壤番茄种子萌发及幼苗生长的影响进行了研究。结果表明:X7 菌株在 25℃和 pH 9.0 的条件下培养,能够获得最高的菌密度;相比盐碱土壤对照,施用生物改良剂或基质的处理的番茄种子萌发时间明显提前,发芽率、发芽势和发芽指数及幼苗存活率、平均株高和株重也显著提高,添加 10%或以上的菌剂的效果最为显著。

**关键词:**盐碱土壤;耐盐细菌;生物改良剂;番茄;种子萌发;幼苗生长

**中图分类号:**S 156.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0146-04

土壤是植物生长的基础,它能够为植物提供必需的水分、养分和机械支持等<sup>[1]</sup>。联合国粮食及农业组织 2012 年的统计数据显示,相比 20 世纪 60 年代,目前全球的人均耕地面积已经减少了 50.6%,除人口持续增长和城镇化进程加快等因素外,土壤盐渍化的不断加剧也是造成耕地面积减少的重要原因之一<sup>[2]</sup>。盐渍化土壤由于盐碱含量高、有机质和无机营养元素贫瘠以及土壤结构板结等因素,对大多数植物的生长存在不同程度的抑制作用,有些植物甚至不能存活<sup>[1,3]</sup>。盐渍化土壤在各大洲都有分布,约有 9.5 亿 hm<sup>2</sup>,占全球陆地面积的 10%,我国的盐碱土壤面积巨大,仅黄河三角洲地区就有 44.29 万 hm<sup>2</sup>,超过该区域面积的 50%<sup>[4-5]</sup>。因此,如何对盐碱土壤进行合理开发利用,对于促进农业生产和改善环境生态效益具有重要的意义。

盐渍化土壤的改良与应用,国内外已经进行了很长时间的探索,综合起来,主要包括以下 3 种措施:1)工程措施,包括建立完善的灌溉措施和现代化的排水系统等;2)化学措施,包括向土壤中施加天然矿物质、有机物质、人工合成物质等;3)生物措施,包括种植耐盐植物、转基因耐盐植物育种、应用微生物菌剂等<sup>[4,6-7]</sup>。工程措施和化学措施对于改良盐碱土壤虽具有一定的成效,但由于受到成本造价高和物质储量限制,难以大面积推广;种植耐盐植物虽能够增加土壤有机质,但对土壤含盐量

改变不大,且周期太长;转基因育种方面,目前尚缺乏可利用的高效耐盐基因资源,而且还有潜在的生物安全问题;而微生物改良剂具有成本低、资源可再生和周期较短等优势,已成为土壤改良剂研发的热点<sup>[6-7]</sup>。

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)菌株 X7 是从盐生植物碱蓬根际土壤中筛选到的耐盐细菌,具有较高的耐盐碱特性和降盐碱能力,前期的研究结果显示,X7 菌株的发酵液能够有效缓解番茄种子萌发过程中所受的盐胁迫作用。有效提高植物种子在盐碱土壤发芽时间和发芽率以及幼苗存活率和生长量是盐碱土壤农业生产的关键技术,为此,该研究针对 X7 菌株,就其发酵条件、改良剂制备及改良剂对盐碱土壤番茄种子的萌发和幼苗生长的影响开展了系列研究,以期为 X7 菌株的进一步开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株 X7 是从盐生植物碱蓬根际土壤中筛选到的耐盐细菌。供试的番茄品种为“天正粉秀”。盐碱土壤采自山东省滨州市北海公园表层 10~20 cm 的土壤。NA 培养基和 Hogland 营养液的制备参考方中达<sup>[8]</sup>的方法进行。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌剂的制备** 将保存的 X7 菌株接种于 NA 培养基平板上,于 25℃条件下过夜活化培养后,转接于 NA 液体培养基(pH 9.0)中,25℃振荡培养过夜制成种子菌,之后,按 1%的比例将种子菌接入新鲜的 NA 液体培养基(pH 9.0)中,于 25℃的条件下振荡培养 3 d,所得发酵液即为菌剂。

**1.2.2 生物改良剂的制备** 将沸石粉、豆粕粉和泥炭按

**作者简介:**于明礼(1973-),男,硕士,实验师,现主要从事植物生物技术和植物病害防治等研究工作。E-mail: yuminglibz\_@126.com.

**基金项目:**滨州市科技发展计划资助项目;滨州职业学院科研计划资助项目(10xykt01)。

**收稿日期:**2015-05-27

质量比 1:1:1 充分混匀制成改良剂基质。向基质中加入 5%、10% 或 20% 的菌剂,搅拌均匀,所得即为生物改良剂 A、B 或 C。

1.2.3 番茄种子萌发及幼苗生长试验 将采集的土样自然风干、碾细,分别按 0.5% 的比例混入改良剂基质、生物改良剂 A、B 和 C,以无改良剂或基质添加的盐碱土为对照。上述土样装入花盆,用 Hogland 营养液浇透备用。

### 1.3 项目测定

1.3.1 不同温度下 X7 菌株生长量 将保存的 X7 菌株接于 NA 培养基平板上,于 28℃ 条件下培养箱过夜活化培养后,转接于 20 mL 的 NA 液体培养基(pH 7.0)中,28℃ 振荡培养过夜,之后,按 1% 的比例接入新鲜的 NA 液体培养基(pH 7.0)中,分别于 15、20、25、30、35、40℃ 的条件下振荡培养,每隔 10 h 取样,用分光光度计测定发酵液的 OD<sub>650</sub>,以此判断菌株的生长量。每个培养温度设 3 个重复。

1.3.2 不同 pH 值下 X7 菌株生长量 X7 菌株的活化与种子菌的准备同前。种子菌按 1% 的比例接入不同 pH 值的新鲜 NA 液体培养基(pH 值分别为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0),于 25℃ 的条件下振荡培养,每隔 10 h 取样,用分光光度计测定发酵液的 OD<sub>650</sub>,以此判断菌株的生长量。每个处理设 3 个重复。

1.3.3 其它指标 取 40 粒消毒后的番茄种子,均匀洒种于花盆中,每天统计出苗情况至连续 2 d 无变化为止。记录各处理的开始萌发日期,统计发芽率、发芽势和发芽指数。每个处理设 3 个重复。统计方法如下:发芽率  $GP(\%) = n/N \times 100$  (n 为最终发芽的种子数, N 为供试种子总数);发芽势  $GE(\%) = n_5/N \times 100$  ( $n_5$  为 5 d 内发芽的种子数, N 为供试种子总数);发芽指数  $GI = \sum(Gt/Dt)$  (Gt 为第 t 天的种子发芽数, Dt 为对应 Gt 的发芽天数)。向花盆中移栽长势一致的番茄幼苗(长有 2 片真叶),每个处理移栽 50 株,3 周后统计幼苗存活率及存活幼苗的平均株高与株重。每天补充蒸馏水,以保持水分平衡。

### 1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对 X7 菌株生长量的影响

由图 1 可知, X7 菌株在不同温度下 NA 液体培养基(pH 7.0)中的生长情况之间有明显差异。菌株于 35℃ 培养时,生长调整期最短,最快进入生长对数期,但稳定期的菌密度(OD<sub>650</sub> 值)却不是最高。菌株于 15、20、40℃ 培养时,生长调整期最长,且稳定期的 OD<sub>650</sub> 值均低于 35℃ 培养。菌株于 25℃ 和 30℃ 培养时,生长调整期

时间长度居中,但稳定期的 OD<sub>650</sub> 值要高于其它培养温度,其中以 25℃ 培养的 OD<sub>650</sub> 值最高。

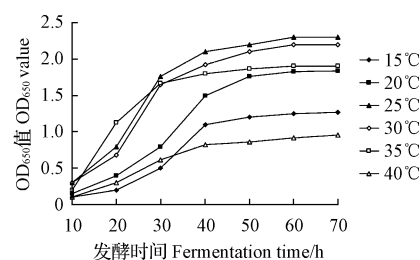


图 1 不同温度对耐盐细菌生长量的影响

Fig. 1 Effect of different temperatures on the growth of salt tolerant bacteria

### 2.2 pH 值对 X7 菌株生长量的影响

由图 2 可知,在初始 pH 7.0 和 pH 8.0 培养基中,菌株的生长调整期最短,最快进入生长对数期,但稳定期的菌密度(OD<sub>650</sub> 值)并不是最高。初始 pH 值高(9.0、10.0、11.0 和 12.0)均延长了菌株的生长调整期,甚至还导致了稳定期菌密度的降低(pH 11.0 和 pH 12.0), pH 10.0 稳定期的 OD<sub>650</sub> 值与 pH 7.0 和 pH 8.0 基本持平,而 pH 9.0 稳定期的 OD<sub>650</sub> 值则为所有处理中最高。这说明,该菌株在合适的较高 pH 值环境下能够获得更高的菌密度。

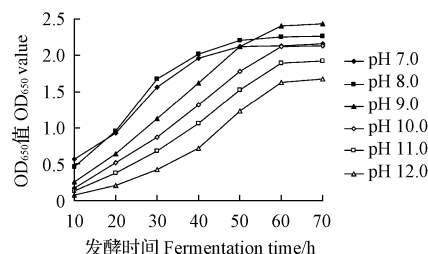


图 2 不同 pH 值对耐盐微生物生长量的影响

Fig. 2 Effect of different pH values on the growth of salt tolerant bacteria

### 2.3 改良剂对番茄种子萌发的影响

表 1 表明,相比无任何添加的盐碱土对照,播种于添加基质、改良剂 A、改良剂 B 或改良剂 C 盐碱土的番茄种子的开始萌发日期明显提前,播种于盐碱土对照的番茄种子,到第 6 天才开始萌发,添加基质、改良剂 A、改良剂 B 或改良剂 C 后,番茄种子的萌发提前 2 d 以上;发芽率、发芽势和发芽指数也明显提高,发芽率、发芽势和发芽指数分别提升 25.71%、137.33% 和 97.98% 以上,其中,以添加改良剂 B 和改良剂 C 的效果最为显著,发芽率、发芽势和发芽指数分别提升 68.53%、493.85% 和 196.76% 以上;盐碱土壤添加改良剂 B 或改良剂 C 后对促进番茄种子萌发的效果之间没有明显差异。这说明对番茄种子萌发的促进作用,不但与添加的基质有关,

表 1

改良剂对番茄种子萌发的影响

Table 1

Effect of ameliorators on the germination of tomato seeds

处理 Treatment	开始萌发时间 Beginning time of germination/d	发芽率 Germination percentage/%	发芽势 Germination potential/%	发芽指数 Germination index
盐碱土 Saline alkali soil	6	29.17	6.67	2.47
盐碱土添加基质 Saline alkali soil adding matrix	4	36.67	15.83	4.89
盐碱土添加改良剂 A Saline alkali soil adding ameliorator A	3	42.33	26.67	5.11
盐碱土添加改良剂 B Saline alkali soil adding ameliorator B	2	49.16	39.61	7.33
盐碱土添加改良剂 C Saline alkali soil adding ameliorator C	2	50.83	40.26	7.51

同时也与添加的菌剂数量密切相关,但菌剂达到一定数量(10%)后,促进作用提升不再明显。

## 2.4 改良剂对番茄幼苗生长的影响

由图 3~5 可知,各处理的 50 株番茄幼苗移栽至花盆生长 3 周后,移栽于盐碱土对照的幼苗仅有 7 株存活,移栽于添加基质盐碱土、添加改良剂 A 盐碱土、添加改良剂 B 盐碱土和添加改良剂 C 盐碱土的分别有 23、35、46、47 株番茄幼苗存活;各处理存活番茄幼苗的平均株高和株重分别如下:盐碱土对照为 3.24 cm 和 0.83 g,添加基质盐碱土为 4.96 cm 和 1.25 g,添加改良剂 A 盐碱土 6.23 cm 和 1.46 g,添加改良剂 B 盐碱土 8.34 cm 和 1.86 g,添加改良剂 C 盐碱土 8.41 cm 和 1.91 g。盐碱土施用基质和改良剂后,相比对照,幼苗的存活率、幼苗株高和株重都得到显著提升,其中以添加改良剂 B 和添加改良

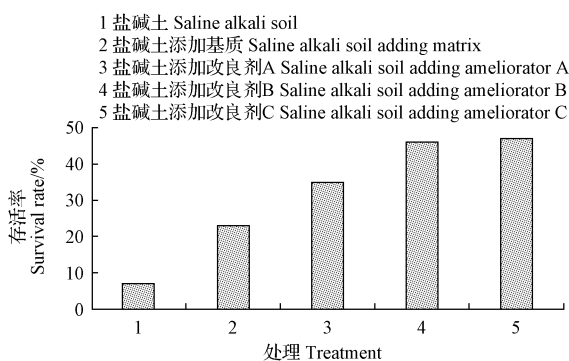


图 3 改良剂对番茄幼苗存活率的影响

Fig. 3 Effect of ameliorators on survival rate of tomato seedlings

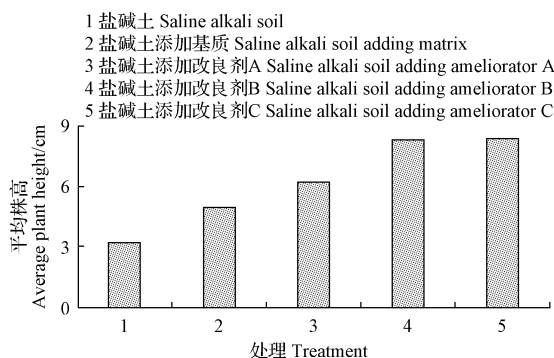


图 4 改良剂对存活番茄幼苗株高的影响

Fig. 4 Effect of ameliorators on plant height of survival tomato seedlings

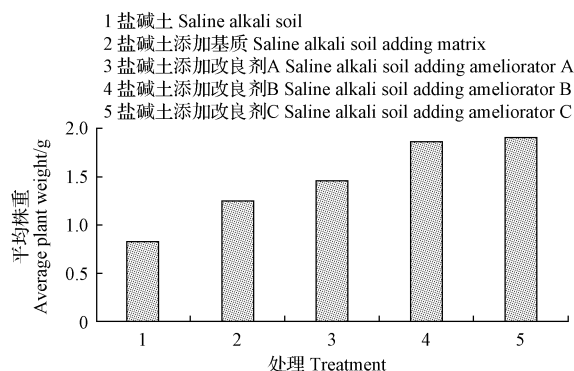


图 5 改良剂对存活番茄幼苗株重的影响

Fig. 5 Effect of ameliorators on plant weight of survival tomato seedlings

剂 C 的效果最为明显,不但基质起到了土壤肥力提高和降盐碱作用,而且菌剂的降盐碱特性也得到了明显发挥。

## 3 讨论与结论

自然界中,存在着一些能够在极端环境下生存的微生物,因其具有独特的生理机制和产生某些特殊的代谢产物,而成为国内外研究的热门领域,而耐盐微生物则是该领域的研究热点<sup>[9]</sup>。根据微生物在不同盐浓度环境下生长的情况,耐盐微生物又可分为嗜盐菌、弱嗜盐菌、中等嗜盐菌、极端嗜盐菌和耐盐菌等<sup>[10]</sup>。耐盐微生物的种类很多,包括真菌、细菌、放线菌等,目前所发现的嗜盐及耐盐细菌主要分布于 *Aetinoabaeria*、*Baeteroidetes*、*Cyanobaeria*、*Firmieutes* 及 *Proteobaeria* 门下 40 余个属种以及 *Halobacteriales* 目的中的 *Halobacteroidaceae* 属<sup>[11]</sup>。盐土中主要的细菌种类有 *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Alcaligenes* 和 *Micrococcus*<sup>[12-13]</sup>。由于耐盐碱微生物种类和生存环境不同,其适宜的生长条件也千差万别。有研究表明,适宜耐盐碱微生物生长的条件,往往也是最适宜菌株去盐除碱的条件<sup>[14]</sup>。该研究中,短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 菌株 X7 的最适生长温度和酸碱度分别为 25℃ 和 pH 9.0,与刘彩霞<sup>[15]</sup> 研究的短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 菌株 J2 的最适生长温度和酸碱度分别为 28℃ 和 pH 7~10 的结果基本一致。

已有的研究表明,耐盐碱微生物缓解盐胁迫并促进植物种子萌发和幼苗生长主要包括以下几个途径:一是通过耐盐碱微生物的降盐除碱作用,降低环境的盐碱浓



度,缓解植物的外部胁迫压力<sup>[16-17]</sup>;二是通过调节植物体内的可溶性蛋白质、可溶性糖以及游离脯氨酸含量等<sup>[18]</sup>,提高植物的盐胁迫耐受力<sup>[19-21]</sup>;三是分泌吡啶-3-乙酸<sup>[22]</sup>,细胞分裂素<sup>[23]</sup>和赤霉素<sup>[24]</sup>等植物生长激素来刺激和促进植物的生长;四是调节植物对矿质元素的吸收,维持植物细胞内的高  $K^+/Na^+$  比率,改善植物的营养状况<sup>[25]</sup>。该研究中已发现 X7 菌株具有较强的降盐除碱作用,X7 菌株培养 5 d 后,发酵液的盐浓度比初始浓度能够降低 45% 以上<sup>[26]</sup>,至于是否具备其它功能,尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 马利静. 基于盐碱土改良的土壤和植物效应研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [2] 赵文武. 世界主要国家耕地动态变化及其影响因素[J]. 生态学报, 2012,32(20):6452-6462.
- [3] 郝禹. 改良物质对盐碱土 pH 值及水溶性盐的影响[J]. 现代农业科技, 2013(16):210-211.
- [4] 赵明范. 世界土壤盐渍化现状及研究趋势[J]. 世界林业研究, 1997(2):84-86.
- [5] 关元秀,刘高焕,刘庆生,等. 黄河三角洲盐碱地遥感调查研究[J]. 遥感学报, 2001,5(1):46-52.
- [6] 陈义群,董元华. 土壤改良剂的研究与应用进展[J]. 生态环境, 2008, 17(3):1282-1289.
- [7] 赵可夫,范海,王宝增,等. 改良和利用盐渍化土壤的研究进展[J]. 园林科技信息, 2004(1):32-35.
- [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [9] 李艳华. 嗜盐与耐盐微生物的分离与系统分类[D]. 保定:河北大学, 2003.
- [10] KUSHNER D J. Life in high salt and solute concentrations; halophilic bacteria[M]. London:Academic Press,1978.
- [11] 杨晓宸. 新疆阿克苏盐矿嗜盐(耐盐)微生物多样性研究[D]. 杭州:浙江大学,2011.
- [12] QUESADA E, VENTOSA A, RODRIGUEZ-VALERA F, et al. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1982, 53:155-161.
- [13] RODRIGUEZ-VALERA F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
- [14] 燕红,钟方,高新亮,等. 耐盐碱菌株的分离筛选及生物学特性和盐碱去除效率的研究[J]. 生态学杂志, 2012, 31(4):1000-1008.
- [15] 刘彩霞. 耐盐碱微生物的筛选及在盐碱土团聚体形成中的作用[D]. 南京:南京农业大学,2009.
- [16] 余宗学,严学亿,安立超. 耐盐微生物的培养与高含盐废水处理的研究[J]. 工业安全与环保, 2008, 34(12):20-22.
- [17] 陈尚智. 枯草芽孢杆菌的固定及其对微污染水体的净化研究[D]. 广州:华南理工大学,2011.
- [18] 史军辉,王新英,刘茂秀. NaCl 胁迫对胡杨幼苗叶生理生化指标的影响[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(11):2022-2028.
- [19] 汪贵斌,曹福亮,游庆方,等. 盐胁迫对 4 树种叶片中 K 和 Na 的影响及其耐盐能力的评价[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(1):30-34.
- [20] 闰道良,连俊方,任燕燕,等. 盐胁迫下施氮对海滨锦葵营养生长期生长的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(6):817-821.
- [21] 刘艳,陈贵林,蔡贵芳,等. 干旱胁迫对甘草幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(11):2259-2264.
- [22] IDRIS E E, BOCHOW H, ROSS H, et al. Use of *Bacillus subtilis* as bio-control agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2004, 111(6):583-597.
- [23] ORTÍZ-CASTRO R, VALENCIA-CANTERO E, LÓPEZ-BUCIO J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling[J]. Plant Signaling and Behavior, 2008, 3(4):263-265.
- [24] JOO G J, KIM Y M, KIM J T, et al. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers[J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(6):510-515.
- [25] 罗欢. 芽孢杆菌对植物的促生和耐盐作用及其相关机制的研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [26] 曲发斌,于明礼,张柱岐,等. 耐盐细菌对番茄种子萌发的影响[J]. 北方园艺, 2014(18):35-38.

## Preparation and Application of Saline Alkali Soil Biological Ameliorators

YU Mingli

(College of biotechnology, Binzhou Polytechnic, Binzhou, Shandong 256603)

**Abstract:** Taking salt tolerance of *Bacillus pumilus* strain X7 and tomato as experimental materials, the fermentation conditions of strain X7 and the effect of biological ameliorators to tomato seed germination and seedling growth on saline alkali soil were studied. The results showed that the strain X7 at 25°C and pH 9.0 culture conditions, could obtain the highest density of bacteria; compared with the saline alkali soil control, the tomato seeds germination time were earlier, and the seed germination rate, potential and index, seedling survival rate, plant height and weight improved significantly after using biological ameliorators or matrix, and in which the biological ameliorators addition of 10% or more strain agents were the most significant effect.

**Keywords:** saline soil; salt tolerant bacteria; biological ameliorators; tomato; seed germination; seedling growth