

DOI: 10.11766/trxb202103240159

张慧洁, 刘俊琢, 吴永红. 藻、菌配合施用对水稻土磷有效性及微生物群落的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1369–1377.

ZHANG Huijie<sup>1, 2</sup>, LIU Junzhuo<sup>1</sup>, WU Yonghong. Effects of Combined Application of Algae and Bacteria on Paddy Soil Phosphorus Availability and Microbial Community[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(5): 1369–1377.

## 藻、菌配合施用对水稻土磷有效性及微生物群落的影响\*

张慧洁<sup>1, 2</sup>, 刘俊琢<sup>1†</sup>, 吴永红<sup>1</sup>

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学现代农业科学学院, 北京 100049)

**摘要:** 解磷菌和微藻广泛用作生物肥料, 影响土壤养分循环及微生物群落的组成和活性。以巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、句容水稻土为试验材料, 通过室内培养实验, 设置施用小球藻 (A)、施用巨大芽孢杆菌 (B)、小球藻和巨大芽孢杆菌配合施用 (A+B)、对照 (CK) 4 个处理, 探索巨大芽孢杆菌和小球藻配合施用对水稻土磷有效性和微生物群落的影响。结果表明, 培养第 30 天, 巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理土壤有效磷含量 ( $15.92 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 显著高于对照和单独施用小球藻的处理 (A:  $14.46 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , CK:  $14.61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 较对照土壤 ( $14.61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 提高 9.0%。巨大芽孢杆菌和小球藻配施还可以显著提高水稻土的 pH、全氮以及总有机碳含量。巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理, 土壤中芽孢杆菌属的相对丰度 (1.70%) 较单独施用巨大芽孢杆菌的处理 (1.33%) 提高 27.9%, 小球藻在绿藻门中的相对丰度 (3.14%) 较单独施用小球藻的处理 (3.04%) 提高 3.18%。巨大芽孢杆菌和小球藻配施也显著提高了土壤微生物的代谢活性和增殖速率。综上, 本研究表明巨大芽孢杆菌和小球藻配合施用可显著提高水稻土磷有效性, 提高土壤微生物的活性, 为藻、菌复合生物肥的开发和利用提供了理论基础, 为提高水稻土磷有效性、缓解磷积累及其环境风险提供了新的视角。

**关键词:** 巨大芽孢杆菌; 小球藻; 土壤磷有效性; 微生物活性

中图分类号: S154; S158 文献标志码: A

## Effects of Combined Application of Algae and Bacteria on Paddy Soil Phosphorus Availability and Microbial Community

ZHANG Huijie<sup>1, 2</sup>, LIU Junzhuo<sup>1†</sup>, WU Yonghong<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** 【Objective】 Phosphorus is a major element essential for biological growth, but its bioavailability and utilization efficiency in soil are low. Microorganisms play important roles in soil phosphorus cycling. In recent decades, phosphate solubilizing bacteria and microalgae have been widely used as biofertilizers, with great effects on soil phosphorus cycling and the composition and activity of microbial communities. Nevertheless, the combined effects of microalgae and bacteria have been

\* 国家自然科学基金项目 (41977101) 和江苏省自然科学基金项目 (BK20181511) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41977101) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181511)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jzhliu@issas.ac.cn

作者简介: 张慧洁 (1996—), 女, 山西忻州人, 硕士研究生。E-mail: 736203910@qq.com

收稿日期: 2021-03-24; 收到修改稿日期: 2021-06-10; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-07-21

given little attention. This study aimed to explore the effects of the combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris* on phosphorus availability and the microbial community in paddy soil. 【Method】 In this study, a laboratory cultivation experiment was carried out by using *Bacillus megaterium*, *Chlorella vulgaris*, and paddy soils from Jurong, Jiangsu, China, with four treatments, including the application of *Chlorella vulgaris* alone(A), application of *Bacillus megaterium* alone(B), combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris*(A+B)and the control without application of *Bacillus megaterium* or *Chlorella vulgaris*(CK). Specifically, we measured soil pH, contents of Olsen-P, total organic carbon(TOC), and total nitrogen(TN). Also, we determined the soil microbial community composition and diversity using 16S and 18S rRNA gene amplification high-throughput sequencing and characterized the metabolic heat release of soil microorganisms using microthermal analysis.【Result】After 30 days of culture, the soil Olsen-P content of combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris*(A+B, 15.92 mg·kg<sup>-1</sup>)was significantly higher than that of the control and *Chlorella vulgaris* alone(A: 14.46 mg·kg<sup>-1</sup>, CK: 14.61 mg·kg<sup>-1</sup>), with an increase of 9.0% compared to the control(14.61 mg·kg<sup>-1</sup>). The combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris* also significantly increased the pH, TN and TOC contents of paddy soil. The relative abundance of *Bacillus* in the soil of the combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris*(1.70%)increased by 27.9% compared to that applied with *Bacillus megaterium* alone(1.33%), and the relative abundance of *Chlorella* in *Chlorophyta* of the combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris*(3.14%)increased by 3.18% compared to that applied with *Chlorella vulgaris* alone(3.04%). Also, the combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris* significantly increased the metabolic activity and proliferation rate of soil microorganisms. 【Conclusion】 This study showed that the combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris* significantly improved the availability of P in paddy soils and the activity of soil microorganisms. This provides practical information for the development and utilization of algae and bacteria-based compound biofertilizers, and a new perspective for improving the phosphorus availability in paddy soils and for alleviating the accumulation of P and reducing environmental risks.

**Key words:** *Bacillus megaterium*; *Chlorella vulgaris*; Soil phosphorus availability; Microbial activity

磷是所有生命体所必需的营养元素之一，在合成遗传物质（DNA、RNA）、能量传递物质 ATP 等基本生化反应中扮演着重要的角色，也是组成生物体支撑结构如膜结构、骨骼等不可或缺的元素<sup>[1]</sup>。长期以来，磷一直被认为是陆地生态系统中仅次于氮的第二大限制植物生长的养分<sup>[2]</sup>。磷矿石是磷元素的重要来源，磷作为肥料应用于农业以来，大量的磷矿石被开采以制作磷肥，近年来，每年约有 2 200 万吨开采自磷矿石中的磷被投入世界经济<sup>[3]</sup>，然而，磷矿石是一种有限且不可再生的资源，有报道称目前已知的储量仅能满足 50~100 年的需求<sup>[4]</sup>。磷在土壤中易被固定，导致磷的有效性和利用率低下、在土壤中过度积累以及环境风险的增加。

微生物在土壤磷循环中起着重要的作用，解磷菌能够通过自身代谢或与其他生物协同作用将固定态磷转化为可溶态（植物可利用态）磷，对其利用是提高土壤磷有效性最环保、经济的方式<sup>[5]</sup>。解磷菌已被广泛用于开发生物肥料，可用作化学肥料的补充剂和环保型磷生物肥料，巨大芽孢杆菌是一种

重要的且研究较为广泛的解磷菌，具有很强的解磷作用。有研究表明巨大芽孢杆菌的施用可以增加土壤细菌和真菌的群落丰富度，提高土壤有效磷含量，并可减少 10%~20%的磷肥施用量<sup>[6]</sup>。

藻类在农业中作为生物肥料和土壤改良剂也越来越受到人们的关注。小球藻由于生长速度快、易培养利用，越来越受到科学研究和工业生产的关注，在农业中作为生物肥料也受到了越来越多的关注和研究<sup>[7]</sup>，成为最重要的养殖和商业使用微藻品种之一。小球藻在农业中用作微藻生物肥料可以增加土壤养分、改善土壤质量，提高植物种子发芽率、产量以及果实质量<sup>[8-9]</sup>。

藻类和细菌在土壤中共同存在，共同影响着生态系统，并具有密切的相互作用关系，互相影响着彼此的生理功能和新陈代谢，且具有共生、竞争、寄生等生物间存在的全部相互作用关系<sup>[10]</sup>。藻菌相互作用受到越来越多的关注和研究，藻菌复合体也广泛应用于废水处理、重金属污染的生物修复、生物燃料的生产等方面<sup>[11]</sup>，然而其在农业方面的应用

还比较少,解磷菌和藻类生物肥料通常单独研究和应用,其配合施用是否对土壤磷循环产生更好的促进效果尚不明确。基于以上研究背景,本研究拟通过室内培养试验探索如下问题:(1)巨大芽孢杆菌和小球藻配合施用对水稻土磷有效性有何影响;(2)巨大芽孢杆菌和小球藻配合施用对水稻土微生物组成和活性有何影响,以期为藻、菌生物肥的开发和利用提供理论基础,通过微生物方式提高土壤磷的有效性和利用率,促进作物生长的同时减少磷肥的施用、降低由磷积累所带来的水体富营养化等环境风险。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试土壤为采自江苏句容水稻田的耕层土壤(0~20 cm)。将采集的新鲜土壤置于阴凉处自然风干,剔除石子、植物根系、秸秆等杂物,过10目筛,备用。

供试细菌为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),菌株编号:1.223,购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心。将其接种于灭菌的LB液体培养基中,于30℃,180 r·min<sup>-1</sup>的条件下培养18 h,得到处于指数生长期的菌悬液(OD<sub>600</sub>=0.8),备用。

供试藻种为普通小球藻(*Chlorella vulgaris*),编号:FACHB-8,购买自中国科学院淡水藻种库。将其接种于灭菌的BG11培养基中,置于25℃,12 h/12 h温室中培养至生长对数期(OD<sub>680</sub>=1.0),备用。

### 1.2 试验设计

称取40 g土壤置于50 mL烧杯中,加入蒸馏水30 mL至土壤淹水,上覆水液面高约1 cm,在上覆水中加入藻液、菌液,设置如下4个处理:1)对照(CK);2)添加小球藻液5 mL和蒸馏水5 mL(A);3)添加巨大芽孢杆菌菌液5 mL和蒸馏水5 mL(B);4)添加小球藻液5 mL和巨大芽孢杆菌菌液5 mL(A+B),每个处理设15个重复,完全随机排列。为保证上述藻液、菌液添加量一致,加入前分别将预培养的藻液、菌液混合均匀,并测定各自的吸光度,其中藻液OD<sub>680</sub>为1.0、菌液OD<sub>600</sub>为0.8。将烧杯置于28℃/22℃,12 h/12 h恒温培养箱培养30 d。每隔3 d添加蒸馏水以保持上覆水高

度始终保持在1 cm左右。每组处理分别在培养0、3、7、15、30 d后采集3个重复测定各指标。

### 1.3 测定指标及方法

**1.3.1 土壤理化性质** 土壤有效磷含量测定使用NaHCO<sub>3</sub>浸提—钼锑抗比色法<sup>[12]</sup>。土壤pH、总有机碳(TOC)、全氮(TN)采用常规土壤农化方法测定<sup>[12]</sup>。土壤pH使用pH计(pHS-3C,上海雷磁)测定,水土比为2.5:1;可溶性有机碳含量使用TOC分析仪(Vario TOC,德国Elementar)测定;总有机碳含量使用高温外热氧化-亚铁滴定法<sup>[12]</sup>;全氮含量使用流动分析仪(Skalar San++ System,荷兰Skalar仪器公司)测定。

**1.3.2 土壤微生物高通量测序** 培养第30天采集各处理土壤样品5~10 g,置于-80℃保存。通过16S/18S rRNA基因扩增子高通量测序来分析土壤微生物群落的组成和多样性。首先,使用土壤DNA提取试剂盒(FastDNA™ SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals)对土壤样品中的DNA进行提取,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度。利用引物341F(CCTACGGGRBGCASCAG)/806R(GGACTACNNGGTATCTAAT)对细菌16S rRNA基因的V3~V4区域进行扩增,利用引物528F(GCGGTAATTCAGCTCCAA)/706R(AATCCRAGAATTTACCTCT)对真核微生物18S rRNA基因的V4区域进行扩增。PCR扩增程序包括:预变性95℃,5 min;(94℃,1 min;57℃,45 s;72℃,1 min)×34个循环;72℃,10 min;16℃,5 min。对PCR产物进行磁珠纯化,采用酶标定量,然后等量混样。使用建库试剂盒(TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit)进行文库构建,构建好的文库使用Qubit@ 2.0 Fluorometer(Thermo Scientific)和Agilent Bioanalyzer 2100 system进行库检,库检合格后,使用Illumina NovaSeq 6000进行上机测序,测序服务委托天津诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

高通量测序所得原始数据处理流程如下:(1)根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据,截去Barcode和引物序列后使用FLASH(V1.2.7)对每个样本的reads进行拼接,得到原始Tags数据(Raw Tags);(2)Raw Tags经过Tags截取和长度过滤、与物种注释数据库进行

比对检测嵌合体序列,并最终去除其中的嵌合体序列,得到有效数据(Effective Tags);(3)利用 Uparse (v7.0.1001)软件按照 97%的序列相似度将 Effective Tags 聚类为操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs),筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列;(4)利用 RDP Classifier (Version 2.2)和 Silva132 数据库以 0.6~1 为阈值对 OTUs 序列进行物种注释,并在各个分类水平统计各样本的群落组成;(5)使用 MUSCLE (Version 3.8.31)软件进行快速多序列比对,得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系;(6)最后对各样本的数据以样本中数据量最少的为标准进行均一化处理。

**1.3.3 微量热分析** 对初始土样和培养第 30 天采集的各处理土壤样品进行微量热分析<sup>[13]</sup>。取 1 g 风干土壤样品置于 4 mL 安瓿瓶中,加入 200  $\mu\text{L}$  蒸馏水预培养 12 h,预培养后加入 40  $\mu\text{L}$  浓度为 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖溶液作为底物,安瓿瓶加盖使其密闭,然后将安瓿瓶置于 TAM III 微量热仪(TA Instrument, Delaware, 美国)中检测放热速率,油浴体系温度恒定为 25  $^{\circ}\text{C}$ 。监测土壤样品的放热功率随时间变化的情况,表征土壤微生物的代谢放热情况。

## 1.4 数据处理

使用 Excel 处理原始数据,所有结果用平均数

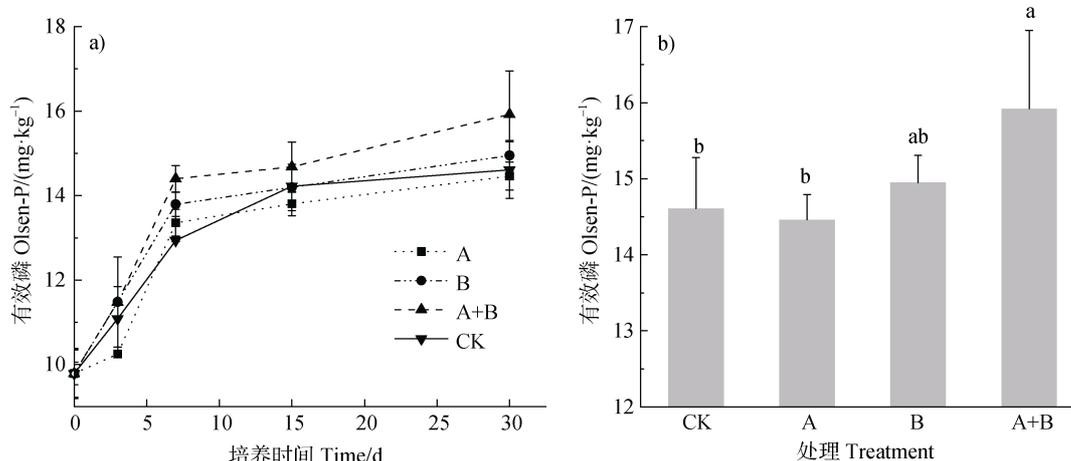
$\pm$ 标准差表示。使用 SPSS22.0 进行差异显著性分析、多重比较和相关性分析,显著性水平为  $P<0.05$ 。使用 Origin 进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 巨大芽孢杆菌和小球藻配施对土壤有效磷含量及土壤理化性质的影响

单独施用巨大芽孢杆菌(B)以及巨大芽孢杆菌和小球藻配施(A+B)的处理在培养过程中均能显著提高土壤有效磷的含量( $P<0.05$ ),而单独施用小球藻(A)的处理中土壤有效磷含量略低于对照(CK,图 1a)。培养 30 d 后,单独施用小球藻的处理土壤有效磷含量( $14.46 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )较对照土壤( $14.61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )低 1.0%;单独施用巨大芽孢杆菌的处理土壤有效磷含量( $14.95 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )较对照土壤( $14.61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )高 2.3%,但与对照处理无显著性差异;巨大芽孢杆菌和小球藻配施处理土壤有效磷含量( $15.92 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )显著高于对照和单独施用小球藻的处理( $P<0.05$ ),较对照( $14.61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )提高 9.0%(图 1b)。

不同于土壤有效磷含量,单独施用小球藻的处理(A)、巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理(A+B)在培养过程中显著提高土壤 pH,两个处理土壤的



注: A: 施用小球藻; B: 施用巨大芽孢杆菌; A+B: 小球藻和巨大芽孢杆菌配合施用; CK: 对照。下同。Note: A: Application of *Chlorella vulgaris*; B: Application of *Bacillus megaterium*; A+B: Combined application of *Bacillus megaterium* and *Chlorella vulgaris*; CK: The control. The same below.

图 1 不同处理土壤有效磷含量随培养时间的变化情况 (a) 以及培养第 30 天土壤有效磷含量 (b)

Fig. 1 Changes of soil Olsen-P contents in different treatments with cultivation time (a) and soil Olsen-P contents in different treatments on day 30 of culture

pH 分别从 5.16 提高至 5.67、5.56，而单独施用巨大芽孢杆菌(B)的处理在培养第 30 天时土壤 pH(5.50)显著低于对照(CK, 5.54, 图 2a)。土壤有效磷的含量与土壤 pH 呈显著的正相关关系( $P < 0.01$ ), 相关系数为 0.52(图 2b)。

与土壤有效磷含量类似, 单独施用巨大芽孢杆菌的处理土壤全氮( $2.00 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及巨大芽孢杆菌和小球

藻配施的处理土壤全氮( $1.96 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )含量显著高于单独施用小球藻的处理土壤全氮( $1.80 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及对照土壤全氮( $1.76 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )含量。单独施用巨大芽孢杆菌的处理土壤总有机碳( $14.24 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理土壤总有机碳( $14.10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )含量显著高于单独施用小球藻的处理土壤总有机碳( $13.74 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及对照土壤总有机碳( $13.80 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )含量。

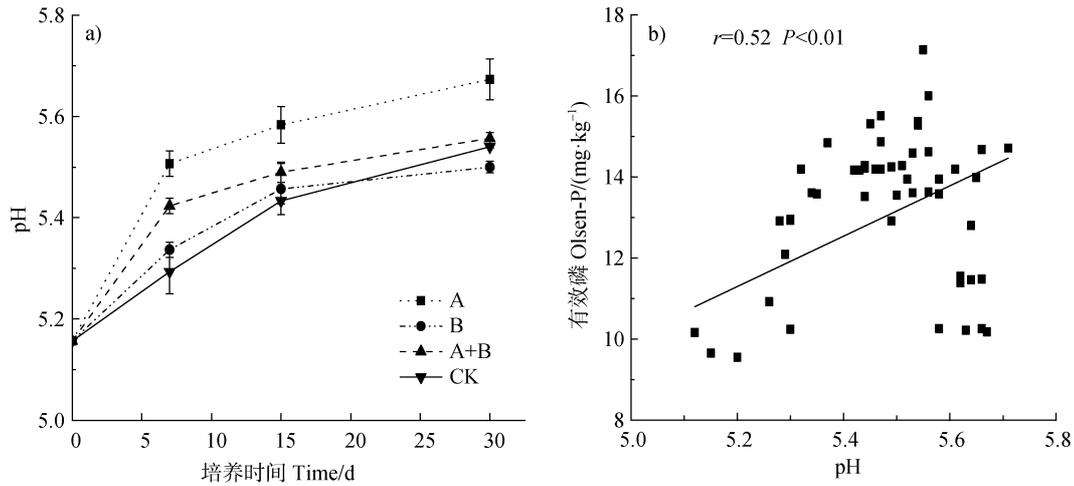


图 2 不同处理土壤 pH 随培养时间的变化情况 (a) 及土壤 pH 与有效磷含量的相关关系 (b)  
Fig. 2 Changes of soil pH in different treatments with cultivation time (a) and the correlation between soil pH and Olsen-P content (b)

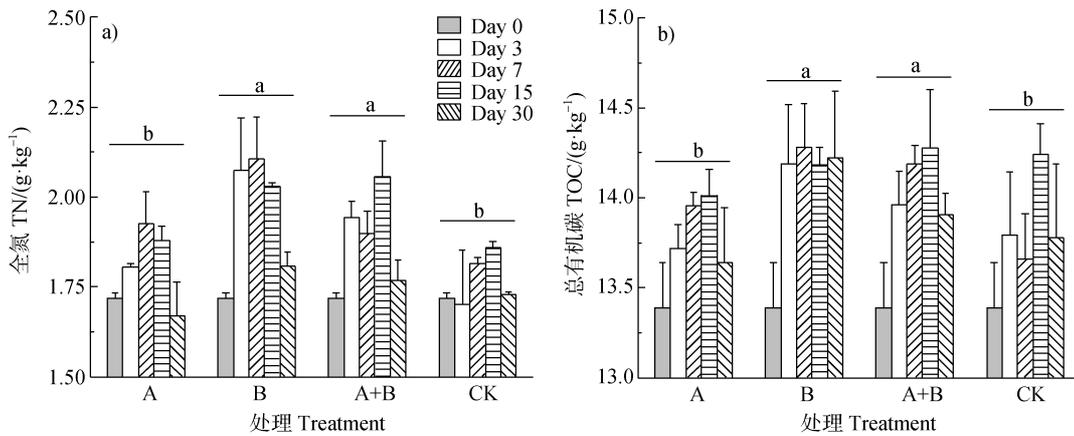


图 3 不同处理土壤全氮 (a)、总有机碳 (b) 含量随培养时间的变化  
Fig. 3 Changes of soil TN (a), TOC (b) contents from different treatments with cultivation time

## 2.2 巨大芽孢杆菌和小球藻配施对土壤微生物群落的影响

通过高通量测序研究了不同处理土壤微生物群落组成。培养第 30 天土壤中的优势原核生物(图 4a)主要为变形菌门(Proteobacteria)(14.00%~17.03%)、酸杆菌门(Acidobacteria)(16.69%~21.98%)、厚壁菌门(Firmicutes)(11.21%~

15.18%)、绿湾菌门(Chloroflexi)(10.57%~12.05%)、拟杆菌门(Bacteroidetes)(10.27%~12.45%),巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理(A+B)中,巨大芽孢杆菌所属的厚壁菌门占比最高(15.18%),较对照(CK, 11.21%)高 35.39%,较单独施用巨大芽孢杆菌的处理(B, 14.87%)高 2.12%。土壤中的优势真核生物(图 4b)主要包括

纤毛亚门 (Ciliophora) (23.63%~33.86%)、绿藻门 (Chlorophyta) (13.03%~18.96%)、子囊菌门 (Ascomycota) (5.82%~12.52%)、丝足虫门 (Cercozoa) (5.67%~11.03%)。巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理 (A+B) 中, 小球藻所属的绿藻门占比最高 (18.96%), 较对照 (15.56%) 高 21.83%, 较单独施用小球藻的处理 (14.80%) 高 28.09%。

在影响土壤微生物群落组成的同时, 巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理亦能提高土壤微生物中芽孢杆菌及小球藻的相对丰度 (图 4c, d)。巨大芽孢杆菌和

小球藻配施的处理土壤中芽孢杆菌属的相对丰度 (1.70%) 较单独施用巨大芽孢杆菌的处理土壤中芽孢杆菌属的相对丰度 (1.33%) 提高 27.9%; 单独施用小球藻的处理土壤中芽孢杆菌属的相对丰度 (1.29%) 较对照土壤中芽孢杆菌属的相对丰度 (1.32%) 降低 2.57%。巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理土壤中, 小球藻在绿藻门中的相对丰度 (3.14%) 较单独施用小球藻的处理土壤 (3.04%) 提高 3.18%; 单独施用巨大芽孢杆菌的处理土壤中, 小球藻在绿藻门中的相对丰度 (0.55%) 较对照土壤 (0.66%) 降低 16.0%。

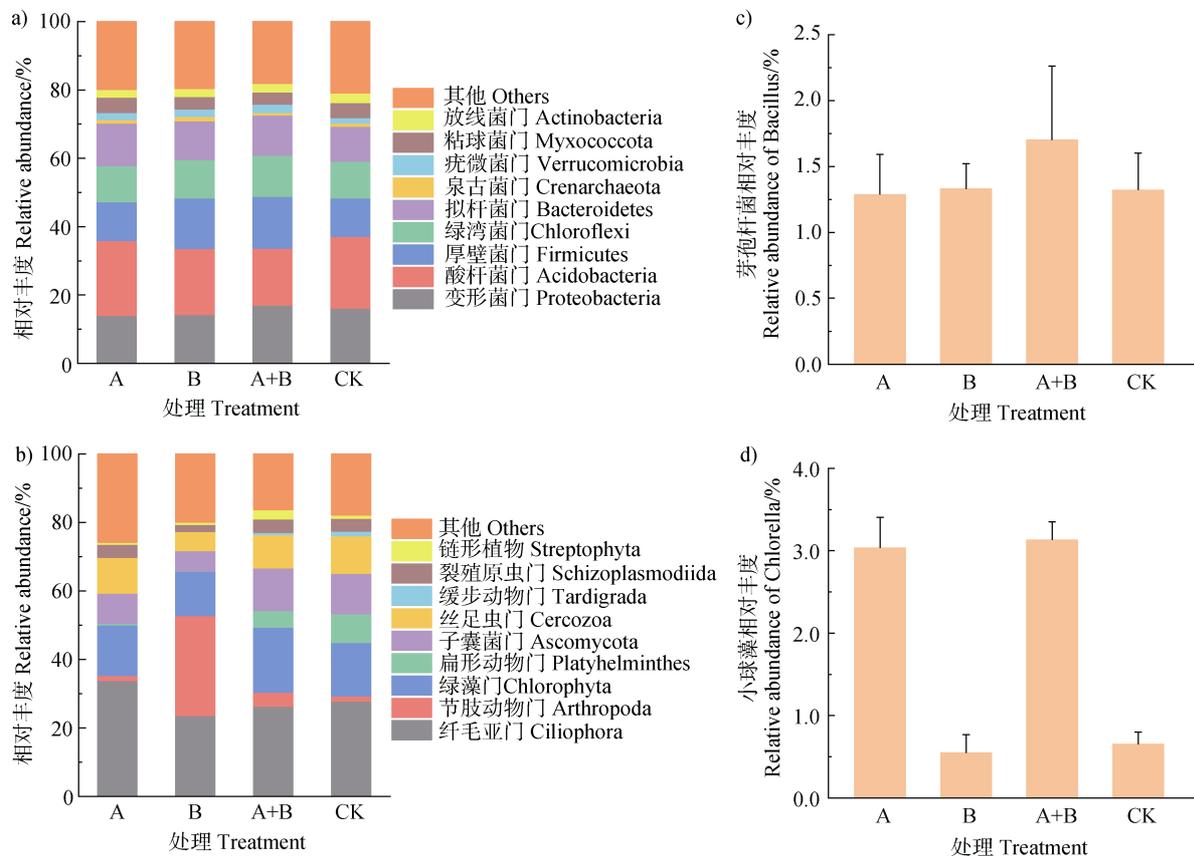


图 4 培养第 30 天各处理土壤中优势原核生物 (a) 和真核生物 (b) 群落结构相对丰度以及芽孢杆菌属的相对丰度 (c) 和小球藻在绿藻中的相对丰度 (d)

Fig. 4 The relative abundance of dominant prokaryote (a) and eukaryote (b) community structure and the relative abundance of *Bacillus* (c), and the relative abundance of *Chlorella* in Chlorophyta (d) of incubated soils on day 30

### 2.3 巨大芽孢杆菌和小球藻配施对土壤微生物活性的影响

在影响土壤理化性质及微生物群落结构的同时, 向土壤中施用巨大芽孢杆菌和小球藻显著影响了土壤微生物的热量—时间曲线 (微生物代谢曲线)。培养第 30 天时, 巨大芽孢杆菌和小球藻配施

的处理最大放热速率 ( $P_{max}$ ) 最高 (322.1  $\mu\text{W}$ ), 显著高于初始土壤 (262.4  $\mu\text{W}$ ) 和其他三个处理 (A: 279.2  $\mu\text{W}$ ; B: 273.5  $\mu\text{W}$ ; CK: 253.2  $\mu\text{W}$ ); 而其达到最大放热速率的时间 ( $T_{max}$ ) 最小 (11.28 h), 显著低于初始土壤 (15.57 h) 和对照土壤 (14.40 h), 表明巨大芽孢杆菌和小球藻配施显著提高了土壤微

生物整体的代谢活性和增殖速率，且这种促进作用至少能够维持 30 d。单独施用巨大芽孢杆菌的  $P_{\max}$  (273.5  $\mu\text{W}$ ) 和单独施用小球藻的处理的  $P_{\max}$  (279.2  $\mu\text{W}$ ) 显著高于初始土壤 (262.4  $\mu\text{W}$ ) 和对照土壤 (253.2  $\mu\text{W}$ )，但单独施用巨大芽孢杆菌的  $T_{\max}$  (13.39 h) 和单独施用小球藻的处理的  $T_{\max}$  (12.33 h)

和对照土壤 (14.40 h) 无显著差异，表明单独施用巨大芽孢杆菌、小球藻对于土壤微生物的代谢活性有一定的提升作用，但不能提高土壤微生物的增殖速率。对照土壤在培养第 30 天时的  $P_{\max}$  (253.2  $\mu\text{W}$ ) 显著低于初始土壤 (262.4  $\mu\text{W}$ )，表明其微生物代谢活性有所降低。

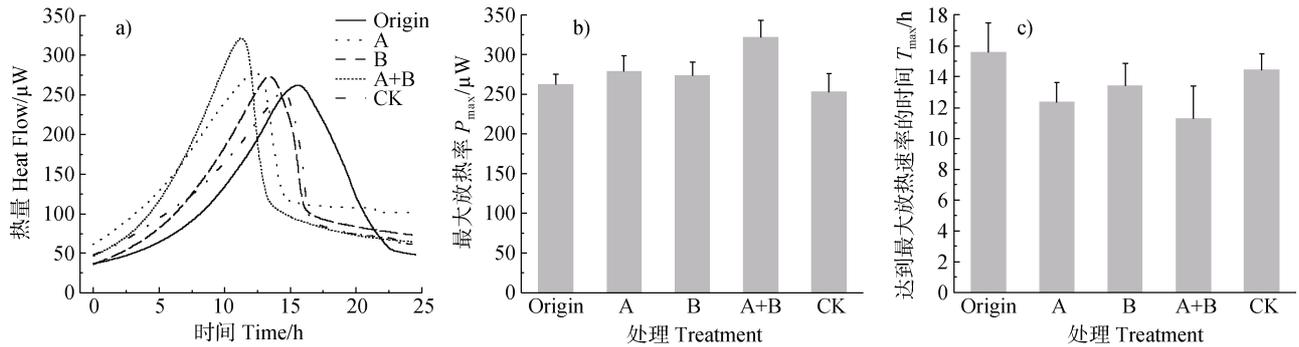


图 5 初始土壤和培养第 30 天各处理土壤的微量热曲线 (a) 及其参数最大放热率  $P_{\max}$  (b) 和达到最大放热速率的时间  $T_{\max}$  (c)

Fig. 5 Power-time curves (a) and calorimetric parameters  $P_{\max}$  (b),  $T_{\max}$  (c) acquired from heat flow curves of the original soil and incubated soils on day 30

### 3 讨论

#### 3.1 巨大芽孢杆菌和小球藻配施有利于提高土壤磷有效性、改善土壤性质

土壤 pH 是影响土壤磷有效性的重要因素<sup>[14]</sup>，本研究表明酸性水稻土 (pH<7.0) 中，有效磷含量与 pH 呈显著正相关，相关系数为 0.52。巨大芽孢杆菌可通过产生有机酸等方式溶解不溶性磷，从而提高磷的有效性<sup>[15]</sup>，有机酸的产生通常使得接种巨大芽孢杆菌的土壤 pH 显著低于对照<sup>[16]</sup>。而小球藻的施用使得土壤 pH 升高，巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理由于巨大芽孢杆菌和小球藻共同作用 pH 略低于单独施用小球藻的处理但显著高于对照。在 pH 低于 5.5 的酸性土壤中，磷易与铁、铝结合形成磷酸盐沉淀或与其氧化物吸附结合而被固定<sup>[17]</sup>；pH<7 时，pH 的升高可以增加铁、铝磷酸盐的溶解并减少铁铝氧化物表面的正电荷，降低铁铝氧化物表面的活性，从而释放铁铝吸附态磷，增加土壤磷的有效性<sup>[18]</sup>。因此，巨大芽孢杆菌和小球藻配施相较单独施用巨大芽孢杆菌，可以通过提高 pH 而进一步提高土壤磷的有效性。Gougoulis 等<sup>[19]</sup>研究发现施用小球藻对有效磷含量的影响不显著，本研究

结果也表明单独施用小球藻时土壤有效磷含量低于对照，这是由于小球藻自身生长吸收利用了土壤中的部分有效磷所致。培养结束时小球藻的生物量增加，表明其生长速率大于死亡速率，在 30 d 的培养期内保持着良好的生长，对磷的吸收量大于释放量，而且藻细胞死亡释放的磷多为有机磷，因此施加小球藻的处理组中土壤有效磷含量有所下降。

巨大芽孢杆菌被普遍认为可以作为土壤改良剂，增加土壤磷的有效性<sup>[20]</sup>，对其解磷作用研究较多。本研究表明，巨大芽孢杆菌的施用除提高土壤磷的有效性以外，还可以提高土壤总有机碳、全氮含量。有研究表明，小球藻的施用尤其是高施用量 (4 g·kg<sup>-1</sup> 干重) 下可以显著提高土壤总有机碳及全氮含量<sup>[8]</sup>，然而本研究发现单独施用小球藻的处理土壤有机碳和全氮含量与对照无显著差异，这可能是由于小球藻的施用量不够高；也可能是相比于藻菌配施处理，单独施用小球藻在土壤中生长速率较低所致。此外，小球藻属于外源有机质，将小球藻施入土壤中后会引起激发效应，加剧短期内的土壤物质循环，使得土壤全氮和总有机碳含量与对照之间无显著性差异。巨大芽孢杆菌和小球藻共同施用显著提高了土壤总有机碳、全氮的含量，并显著

提高土壤 pH, 有效改良土壤酸化、改善土壤性质、提高土壤质量。

### 3.2 巨大芽孢杆菌和小球藻配施能够改变土壤微生物群落结构、提高土壤微生物活性

外来微生物的引入可通过不同方式改变土壤微生物群落结构<sup>[21]</sup>。巨大芽孢杆菌和小球藻配施的处理中芽孢杆菌属的相对丰度较单独施用巨大芽孢杆菌的处理提高 27.9%, 小球藻属的相对丰度较单独施用小球藻时提高 3.18%, 表明巨大芽孢杆菌和小球藻互相促进。有研究表明巨大芽孢杆菌和小球藻能够形成良好的共栖互利关系, 巨大芽孢杆菌能够帮助小球藻适应环境并促进其生长<sup>[22]</sup>, 微藻浆施用于土壤可以刺激异养活性并促进细菌生长<sup>[23]</sup>。小球藻可通过光合作用固碳, 并为异养细菌巨大芽孢杆菌提供碳源及氧气; 巨大芽孢杆菌严格好氧, 又通过呼吸作用将氧气转化为二氧化碳为小球藻光合作用提供底物<sup>[24]</sup>。此外, 细菌也为藻类提供生长激素和维生素等从而建立互利共生关系<sup>[25]</sup>。由于这种互利共生关系的存在, 促进了两种生物的生长繁殖, 因而配合施用较单独施用更有利于提高其相对丰度, 有利于巨大芽孢杆菌解磷而进一步提高土壤有效磷的含量。

微生物生长代谢活动产生大量的热, 其趋势与微生物的生长特征一致, 因此可以用热动力学曲线来表示微生物的代谢活性, 较大  $P_{\max}$  (最大放热速率) 和较小  $T_{\max}$  (出峰时间) 代表较高的土壤微生物代谢活性<sup>[26]</sup>。巨大芽孢杆菌和小球藻的互利共生关系促进土壤微生物群落生长繁殖, 提高土壤微生物活性和增殖速率。这可能有两方面的原因, 一方面外来微生物的引入刺激了土著微生物的生长繁殖; 另一方面巨大芽孢杆菌和小球藻作用对土壤有效磷、全氮及总有机碳含量的提高为微生物提供了更多的代谢底物, 从而提高其代谢活性。

## 4 结 论

巨大芽孢杆菌和小球藻配施可以通过巨大芽孢杆菌的解磷作用、藻菌共同作用提高水稻土 pH、增加土壤微生物中芽孢杆菌和小球藻的相对丰度、刺激土壤微生物活性提高土壤磷有效性, 在不外加磷肥的条件下增加土壤有效磷、全氮和总有机碳含量,

改善土壤质量。因此, 巨大芽孢杆菌和小球藻配施是提高水稻土磷有效性的有效方式, 并可减少磷肥的施用、降低磷积累带来的水体富营养化等环境风险, 是环境友好且可持续的农业措施。

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] Ruttenberg K C. The global phosphorus cycle[M]//Treatise on Geochemistry. Amsterdam : Elsevier, 2003: 585—643.
- [ 2 ] Liang J L, Liu J, Jia P, et al. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining[J]. The ISME Journal, 2020, 14( 6 ): 1600—1613.
- [ 3 ] Reijnders L. Phosphorus resources, their depletion and conservation, a review[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2014, 93: 32—49.
- [ 4 ] Cordell D, Drangert J O, White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought[J]. Global Environmental Change, 2009, 19( 2 ): 292—305.
- [ 5 ] Owen D, Williams A P, Griffith G W, et al. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 86: 41—54.
- [ 6 ] Zhao Y N, Mao X X, Zhang M S, et al. The application of *Bacillus megaterium* alters soil microbial community composition, bioavailability of soil phosphorus and potassium, and cucumber growth in the plastic shed system of North China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2021, 307: 107236.
- [ 7 ] Safi C, Zebib B, Merah O, et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014, 35: 265—278.
- [ 8 ] Alobwede E, Leake J R, Pandhal J. Circular economy fertilization: Testing micro and macro algal species as soil improvers and nutrient sources for crop production in greenhouse and field conditions[J]. Geoderma, 2019, 334: 113—123.
- [ 9 ] Odgerel B, Tserendulam D. Effect of *Chlorella* as a biofertilizer on germination of wheat and barley grains[J]. Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences, 2017: 26—31.
- [ 10 ] Fuentes J L, Garbayo I, Cuaresma M, et al. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds[J]. Marine Drugs, 2016, 14( 5 ): 100.
- [ 11 ] Ramanan R, Kim B H, Cho D H, et al. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34( 1 ): 14—29.
- [ 12 ] Lu R K. Analytical methods for soil and

- agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [ 13 ] Jing Z W, Chen R R, Wei S P, et al. Response and feedback of C mineralization to P availability driven by soil microorganisms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 105: 111—120.
- [ 14 ] Wang X C, Deng X Y, Pu T, et al. Contribution of interspecific interactions and phosphorus application to increasing soil phosphorus availability in relay intercropping systems[J]. *Field Crops Research*, 2017, 204: 12—22.
- [ 15 ] Saeid A, Prochownik E, Dobrowolska-Iwanek J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species[J]. *Molecules*, 2018, 23 ( 11 ): 2897.
- [ 16 ] Wyciszkievicz M, Saeid A, Chojnacka K. *In situ* solubilization of phosphorus-bearing raw materials by *Bacillus megaterium*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17 ( 7 ): 749—758.
- [ 17 ] Mkhabela M S, Warman P R. The influence of municipal solid waste compost on yield, soil phosphorus availability and uptake by two vegetable crops grown in a Pugwash sandy loam soil in Nova Scotia[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2005, 106 ( 1 ): 57—67.
- [ 18 ] Penn C J, Camberato J J. A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants[J]. *Agriculture*, 2019, 9 ( 6 ): 120.
- [ 19 ] Gougoulas N, Papapolymerou G, Karayannis V, et al. Effects of manure enriched with algae *Chlorella vulgaris* on soil chemical properties[J]. *Soil and Water Research*, 2018, 13 ( 1 ): 51—59.
- [ 20 ] Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 522—537.
- [ 21 ] Gadhave K R, Devlin P F, Ebertz A, et al. Soil inoculation with *Bacillus* spp. modifies root endophytic bacterial diversity, evenness, and community composition in a context-specific manner[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76 ( 3 ): 741—750.
- [ 22 ] Chen Y F. Research on phenotypic changes of *Chorella* of the influence of commensal bacteria[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016. [陈咏芳. 共栖菌影响下小球藻表型变化研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.]
- [ 23 ] Marks E A N, Miñón J, Pascual A, et al. Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 605/606: 610—617.
- [ 24 ] Perera I, Subashchandrabose S R, Venkateswarlu K, et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: An underexplored microbiota[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102 ( 17 ): 7351—7363.
- [ 25 ] Teplitski M, Rajamani S. Signal and nutrient exchange in the interactions between soil algae and bacteria[M]//*Biocommunication in soil microorganisms*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011: 413—426.
- [ 26 ] Xu J B, Wang Y L, Liu M, et al. Use of BIOLOG and microcalorimetry in combination to study factors of carbon sources stimulating metabolic activity of soil microbe in red soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55 ( 1 ): 203—212. [徐江兵, 王艳玲, 刘明, 等. BIOLOG与微量热耦合研究提高红壤微生物代谢活性的碳源因子[J]. *土壤学报*, 2018, 55 ( 1 ): 203—212.]

(责任编辑: 卢 萍)