

# 细菌菌体对白浆土腐殖质转化的影响

陈泽<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1</sup>, 高士珩<sup>1</sup>, 孟敬洋<sup>1</sup>, 王威<sup>1</sup>, 程伟<sup>2</sup>, 崔俊涛<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 资源与环境学院, 长春 130118; 2. 吉林省嘉博生物科技有限公司, 长春 130000)

**摘要:**采用白浆土为供试材料,利用混皿法对白浆土土样进行筛菌,将筛选得到的优势菌种进行发酵,设置1%,3%,5%三种不同比例的菌体接种量,在相同条件下与培养好的白浆土进行共培养,探究细菌菌体对白浆土中水溶性腐殖质转化的影响,为土壤腐殖质转化的微生物学机理研究和土壤有机培肥研究提供理论基础。结果显示:(1)各处理WSS均表现为先降低后升高的趋势。(2)其中添加1%细菌菌体的处理有机质含量波动最为平缓,先降低后增加,添加3%细菌菌体的处理在30 d开始有机质含量不断增加。而添加5%细菌菌体,有机质含量在30 d开始增加,在60 d开始下降,各处理的土样中,有机质含量在120 d内始终高于对照水平。(3)各处理的土壤当中的HE含量都是在加入细菌菌体后明显增加,然后下降,其中添加3%细菌菌体处理中的HE含量变化最为明显。各处理的HA含量都是不断降低,其中添加1%和3%菌体的处理中HA含量降低速度快。培养结束后,各处理FA含量变化不明显。(4)培养初期,细菌菌体的繁殖促使各处理土样中的微生物数量增大,然后降低,最后趋于平缓。微生物量碳的相对含量在添加不同比例的细菌菌体后均高于对照组,且添加1%细菌菌体的处理组微生物量碳的相对含量最高。

**关键词:**白浆土;腐殖质转化;细菌

中图分类号:S153.622

文献标识码:A

文章编号:1005-3409(2017)04-0368-05

## Effects of Bacterial on Humus Transformation in Albic Soil

CHEN Ze<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>1</sup>, GAO Shiheng<sup>1</sup>, MENG Jingyang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, CHENG Wei<sup>2</sup>, CUI Juntao<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Environment, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China;

2. Jilin Province Jiabo Biological Technology Co., Ltd., Changchun 130000, China)

**Abstract:** The albic soil was used as the material for the test, the mixed soil was used to screen the algae soil, and the dominant strains were fermented. The inoculation quantities of 1%, 3%, 5% of the three kinds of bacteria were set up. Under the same conditions, the treated bacteria were cultured with the cultured albic soil. The effects of bacterial cell on the transformation of water-soluble humus in albic soil were investigated. The theoretical basis for the study of microbial mechanism of soil humus transformation and soil organic fertilization was provided. The results show that: (1) all treatments show that WSS content is a trend of decreasing first and then increasing; (2) the content of organic matter in the treatment of 1% bacterial is the most gentle, decreases first and then increases, and the content of organic matter increases on the thirtieth day after adding 3% bacterial, the content of organic matter increases from thirtieth day to sixtieth day, and the content of organic matter in treated soil is always higher than that in control on one hundred and twentieth day; (3) the contents of HE in the treated soils increase significantly after adding the bacterial, and then decrease, the HE content in the treated 3% bacterial is the most obvious. the content of HA in each treatment decreases continuously, and the contents of HA in adding 1% and 3% bacterial decrease rapidly, at the end of the incubation, the FA content does not change obviously; (4) at the initial stage of culture, the number of microorganisms in the treated soils increases and then decreases, the relative content of microbial biomass carbon was higher than that of the control after adding different concentrations of bacterial, and the relative content of microbial biomass carbon of the treatment group with 1% bacterial is the highest.

**Keywords:** albic soil; humus transformation; bacterial

收稿日期:2016-11-04

修回日期:2016-11-18

资助项目:国家基础研究计划项目(2009CB426308);吉林省科技厅项目(20130206018NY);土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放课题项目(Y412201454)

第一作者:陈泽(1991—),男,内蒙古乌兰浩特人,研究生,硕士,主要从事环境工程微生物研究。E-mail:877501765@qq.com

通信作者:崔俊涛(1968—),男,吉林长春人,副教授,博士,主要从事环境工程微生物研究。E-mail:1597060453@qq.com

白浆土是在温带半湿润及湿润区森林、草甸植被下,在微度倾斜岗地的上轻下粘母质上,经过白浆化等成土过程形成的具有暗色腐殖质表层、灰白色的亚表层—白浆层及暗棕色的粘化淀积层的土壤<sup>[1]</sup>,在东北黑土地带有一种低产田就叫白浆土,主要分布在黑龙江东部、东北部和吉林东部,以三江平原最为集中;白浆土是东北地区主要耕地土壤之一,仅黑龙江省白浆土面积为 330 万  $\text{hm}^2$ , 占全省总土地面积 7.47%, 全省总耕地面积的 10.08%, 在耕地土壤中居第三位。由于白浆土通透性差,养分缺乏导致土壤肥力不足,所以对白浆土土壤的改良成为了提高粮食产量,改善农作物质量的重要途径之一。

腐殖质是已死的生物体在土壤中经微生物分解而形成的有机物质,黑褐色,含有植物生长发育所需要的一些元素,能改善土壤,增加肥力<sup>[2]</sup>,因此腐殖质对土壤肥力具有重要作用。有关土壤腐殖质的研究最早可追溯到罗马时代,但直到 20 世纪初,有关土壤腐殖质的发生与土壤微生物之间关系的研究才蓬勃发展起来<sup>[3]</sup>,腐殖质的形成是个复杂的物质循环过程,主要源于植物残体的分解和微生物的合成<sup>[4]</sup>。近年来关于微生物土壤腐殖质转化的研究日趋增多,崔俊涛<sup>[5]</sup>以黑钙土为供试土壤,分别研究了培养条件下,玉米桔秆粉、不同温度、不同土壤含水量、不同氧气和二氧化碳浓度等影响因子对微生物数量、种群丰富度和种群更替的影响,以及不同微生物在土壤 FA, HA 形成与转化中的作用,得出结论:土壤微生物优势种群在 FA, HA 的转化过程中发挥着重要作用,研究优势微生物种群的数量、性质可以表征土壤 FA, HA 的转化趋势。王菊花<sup>[6]</sup>采用不添加有机物料方案研究微生物在土壤腐殖质转化中的作用,得出结论:微生物与腐殖质的形成和分解有着重要的相关性,土著菌,外来菌均参与 HA, FA 的形成与转化。进一步证明了微生物是土壤有机质的活性部分,是土壤中最活跃的部分。微生物的生长和活性对土壤性质的性质包括营养,质地, pH 值, 温度和水含量等敏感,所以微生物群落的动态变化可以表示土壤质量的改善效果<sup>[7-8]</sup>。但关于微生物对白浆土中腐殖质转化的研究还未见报道。

本研究利用白浆土中分离纯化的优势细菌菌种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的菌体对白浆土进行处理,进行阶段性培养,并定期测量土壤中溶性物质(WSS)含碳量,有机质含量,可提取腐殖物质总量(HE)含量,胡敏酸(HA)含量,富里酸(FA)含量以及微生物数量,对其变化规律进行研究,进而分析细菌菌体与腐殖质转化的关系,从而可以为维护碳平

衡、保护环境和改善气候提供理论参考,以期提高低产率白浆土的质量,为土壤腐殖质转化的微生物学机理研究和土壤有机培肥研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试土样供试土壤为白浆土,采自吉林省大安市新荒,采样深度为 15—25 cm。有机质含量为 28.9 g/kg,全氮量为 2.9 g/kg,全磷量为 1 g/kg,全钾量为 21.6 g/kg, pH 值为 6.3,呈微酸性。其矿物组成以水云母为主,伴有少量高岭石,蒙脱石和绿泥石。供试培养基牛肉膏—蛋白胨培养基,培养基用量约 20 ml/皿。供试菌种供试菌种直接由白浆土中分离得到,然后从中筛选优势及所需细菌菌种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),进行纯化,保留菌种,备用。

### 1.2 试验方法

先取少量白浆土进行预处理,混匀,过筛,去砾石,去未腐烂动植物残体,之后在培养箱中 37℃ 条件下预培养。然后从预处理的白浆土中筛选出优势细菌菌种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),利用 15 L 发酵罐进行深层液体发酵培养。每次取 100 ml 新鲜菌体悬液在 12 000 r/min 下离心 15 min,弃上清,再加入 100 ml 的生理盐水(0.85% NaCl)洗涤菌体,12 000 r/min 下离心 15 min,离心 2 次,弃上清,收集菌体。

取经过预培养的白浆土 50 kg,将其分成 3 份,每份为 2.88 kg,将细菌菌体以 1%(28.8 g), 3%(86.4 g), 5%(144 g)的量拌入三份土样中并搅拌均匀,同时设置不添加细菌菌体的白浆土为空白对照,共 4 个处理,用无菌水调节土壤含水量至 25%。然后将搅拌均匀的 4 个处理的样品利用称重法分成每份 80 g 的小份,每个处理 3 次重复,放入高压灭菌的培养瓶中 37℃ 条件下培养,在整个培养期间,当水分蒸发至重量的 2%时,补无菌水至原重量。分别于 0, 30, 60, 90, 120 d 定期整瓶采样,测定土壤中溶性物质(WSS)含碳量,有机质含量,可提取腐殖物质总量(HE)含量,胡敏酸(HA)含量,富里酸(FA)含量以及微生物数量。

### 1.3 腐殖质组成测定方法

采用腐殖质组成修改法。

(1)溶性物质(WSS)提取方法。将土样过 0.25 mm 筛,并称取 5 g 于 100 ml 塑料离心管中,加入蒸馏水搅拌均匀,土水比为 1:6(3 ml),然后在 70~72℃ 下的恒温水浴振荡器上震荡,提取 1 h,取下后

以 3 500 转/min 离心 20 min,分两次取上清液 10 ml,用定量中速滤纸过滤到 50 ml 容量瓶中,并用蒸馏水洗残渣 3 次并定容。

(2)可提取腐殖物质总量(HE)提取方法。向上一步骤中的水溶性物质提取后离心管中的残渣加入 30 ml 0.1 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (pH 值=13),用玻璃棒搅拌均匀,然后在 70~72℃ 下的恒温水浴振荡器上震荡 1 h,取下后以 3 500 rpm 离心 20 min,将上清液用中速定量滤纸过滤到 50 ml 容量瓶中,用 10 ml 0.1 mol/L 的 NaOH 和 0.1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  洗 2 次,用蒸馏水定容到 50 ml 容量瓶中,此即全土腐殖物质总量(HE)。

(3)胡敏酸(HA)、富里酸(FA)提取方法。取上一步骤碱提取液(HE)30 ml,用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  将 pH 值调至 1~1.5,于 60~70℃ 下保温 1 h,在室温条件下过夜放置,当 HA 完全沉淀时将溶液用中速定量滤纸过滤,分离出沉淀 HA,滤液即为 FA,将滤液用蒸馏水定容至 50 ml 容量瓶中,滤纸上的 HA 沉淀用 0.05 mol/L NaOH 洗涤 3 次,弃去洗液,再用 60℃ 预热的 0.05 mol/L NaOH 将 HA 沉淀溶解至 50 ml 容量瓶中,用 0.05 mol/L NaOH 定容后定碳,FA 用差减法。

(4)其他土壤基本性质的测定方法。土壤 pH 值的测定:电位法<sup>[9]</sup>。全磷测定采用铝锑抗比色法<sup>[9]</sup>。全钾、全氮测定采用半微量开氏法<sup>[9]</sup>。有机质及提取物的含量测定:沙浴加热  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  容量法<sup>[10]</sup>。土壤微生物量碳的测定采用氯仿熏蒸-TOC 法<sup>[9-11]</sup>。微生物数量的测定采用稀释倍数混血法<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加细菌菌体对白浆土当中有机质含量的影响

有机质是土壤的重要组成部分之一,是植物吸收养分的重要来源,同时也可以改善土壤结构和物理化学性质包括土壤的缓冲性能、吸附、离子交换性能和络合能力等;通常认为,有机肥料和化肥可以保持土壤的可持续性,并增强有机碳的积累<sup>[13-15]</sup>,结果表明,除了化肥和有机肥料,细菌也可以提高土壤的物理化学性质,显著增强有机质含量,由图 1 可以看出,添加细菌菌体后土壤当中有机质含量变化为:加入菌体后三个处理的土样中有机质含量与对照相比均明显提升,其中添加 1% 细菌菌体的处理波动最为平缓,先降低后增加,从 60 d 时开始变化不大,在 29%~30% 处波动。添加 3% 细菌菌体的处理在 30 d 开始有机质含量不断增加。而添加 5% 细菌菌体,有机质含量在 30 d 开始增加,在 60 d 开始

下降,在 90~120 d 时变化不明显,为 31%~32%。而 3 种处理的土样中,有机质含量在 120 d 内始终高于对照水平。可见,添加细菌菌体可以增加白浆土中有机质的含量,可能是大部分细菌菌体被白浆土利用,导致有机质的含量增加,在后期变化不明显的原因可能是白浆土中微生物分解能力下降,同时白浆土中供微生物生长的养分也耗尽,最终导致白浆土中有机质含量增加平缓。

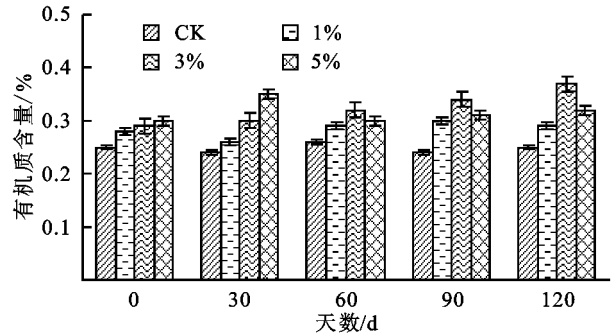


图 1 不同处理条件下有机质含量的变化

### 2.2 添加细菌菌体对白浆土中水溶性物质含碳量(WSS)的影响

由图 2 可以看出,整个培养期间,各处理 WSS 含碳量均表现为先降低后升高的趋势,这是因为培养初期,菌体大量繁殖需要碳源,利用水溶性有机物中的小分子物质供其自身生长,所以致使 WSS 数量降低,其中,5% 处理条件下对 WSS 消耗最大。Gregorich 等<sup>[16]</sup>指出 WSS 是微生物重要的基质,在接种各比例的菌体后不久就会被快速消耗。随培养时间的增加,土壤中其他的有机组分降解成小分子,这些小分子进入 WSS 中,因此 WSS 含碳量又升高。

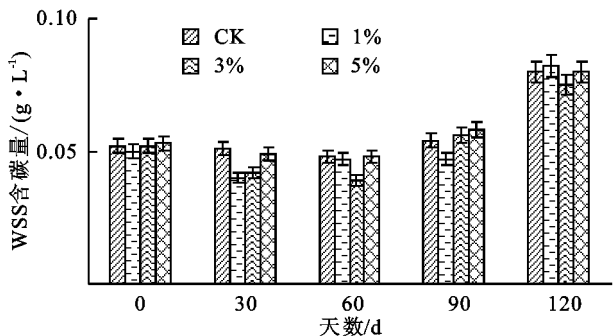


图 2 不同处理条件下 WSS 含碳量的变化

### 2.3 添加细菌菌体对白浆土当中 HE, HA 和 FA 含量的影响

土壤微生物的优势种群是土壤物质流和能量流的主要推动者,因此,本研究在首先明确供试白浆土细菌优势种的前提下,对不同比例处理条件下,白浆土中优势细菌在土壤腐殖质转化中的作用进行了研究。由图 3 可看出,3 个处理的土壤当中的 HE 含量都是在加入后

明显增加,然后下降,到 60 d 时降至最低,随后又不断增加,其中添加 3%细菌菌体处理中的 HE 含量变化最为明显,在 60 d 后提升速度最快,而添加 1%和 5%细菌菌体处理中的 HE 含量的变化较为平缓。随着菌体比例的提高,HE 呈波动性变化,但 5%细菌菌体处理总体上来看使 HE 降低,我们认为这与培养后期真菌区系的出现密切相关。从反面也说明了土壤微生物的旺盛活动会降低土壤腐殖质的积累。

由图 4 中可见各处理的 HA 含量都是不断降低,其中添加 1%和 3%菌体的处理中 HA 含量降低速度快,在 60 d 时降至平缓,而 5%处理在 120 d 内下降速度基本未变。培养结束后,各处理 FA 含量变

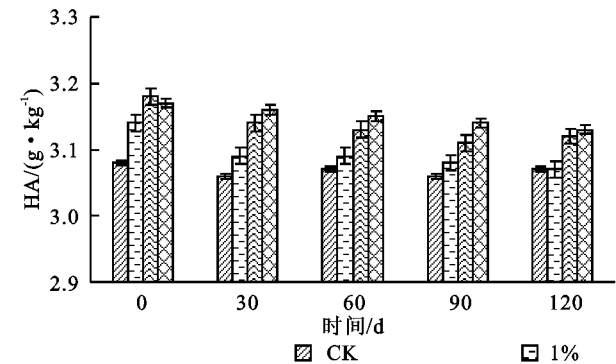


图 4 不同处理条件下 HA 和 FA 含量的变化

2.4 添加细菌菌体对白浆土可培养微生物数量及微生物碳含量的影响

在整个培养过程中,添加不同比例的菌体的各个处理对微生物的生长具有一定的影响,培养初期,细菌菌体的繁殖促使各处理土样中的微生物数量增大,然后降低,最后趋于平缓,且明显高于对照组。见表 1,不同比例菌体处理对细菌、真菌和放线菌数量的影响均差异显著。3%是多数土壤微生物生长较适合的处理条件,随着培养天数的增加,微生物的生长速度加快,因此,在 30 d 培养试验中细菌、真菌、放线菌的数量便达到峰值。比例大的菌体对微生物的生长具有一定的抑制作用,微生物数量达到峰值时间延迟到 60 d。到 120 d 时,各个处理的微生物数量趋于稳定(见图 5)。

由图 5 可见,微生物量碳的相对含量(微生物量碳的相对含量为微生物量碳占总有机碳的百分数)在添加不同比例的细菌菌体后均高于对照组,且添加 1%细菌菌体的处理组微生物量碳的相对含量最高,因此,可以得出添加细菌菌体可以促进微生物量碳的形成;但随着培养天数的增加,微生物量碳的相对含量却在逐渐降低,这可能是因为白浆土里养分较少,随着培养时间增加,菌体形成的易分解养分消耗尽,

化不明显。但无论 HA 含量还是 FA 含量添加菌体的处理始终高于对照组,可见添加细菌菌体增加了 HA 和 FA 含量,促进了 HA 和 FA 的合成。

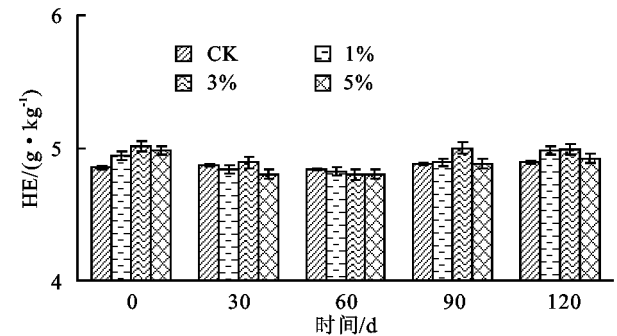
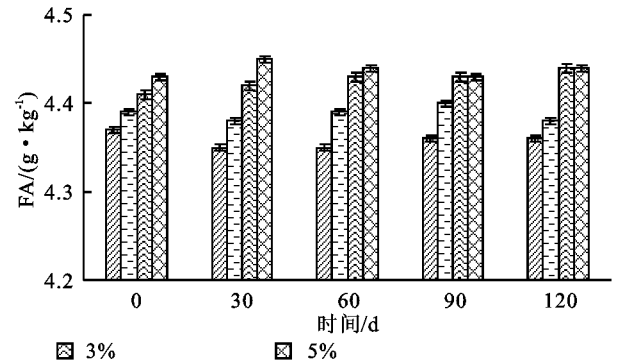


图 3 不同处理条件下 HE 含量的变化



导致白浆土中微生物的能量和营养不足,微生物量碳相对含量下降。在自然条件下,微生物是土壤腐殖质形成的必要条件。同样,耕作制度、栽培制度及施肥制度也势必从这三个方面影响土壤腐殖质的形成与转化。影响土壤有机质形成与转化有诸多因素,但这些因素都是通过影响土壤微生物的种类、数量、活性来影响土壤有机质形成与转化的。

表 1 不同处理对微生物数量的影响

处理	均值	标准差	LSD	
			LSD <sub>5%</sub> 显著水平	LSD <sub>1%</sub> 极显著水平
细菌(1%)	5.78	0.107	b	A
细菌(3%)	6.36	0.254	a	A
细菌(5%)	6.36	0.106	a	A
真菌(1%)	3.24	0.270	a	A
真菌(3%)	3.46	0.288	b	B
真菌(5%)	3.43	0.301	b	A
放线菌(1%)	4.90	0.138	a	A
放线菌(3%)	4.83	0.104	a	A
放线菌(5%)	5.02	0.109	b	B

注:可培养微生物数量均值均为对数值。

3 结论

(1) 添加细菌菌体后土壤当中有机质含量升高,添加 3%细菌菌体的处理有机质含量不断增加。

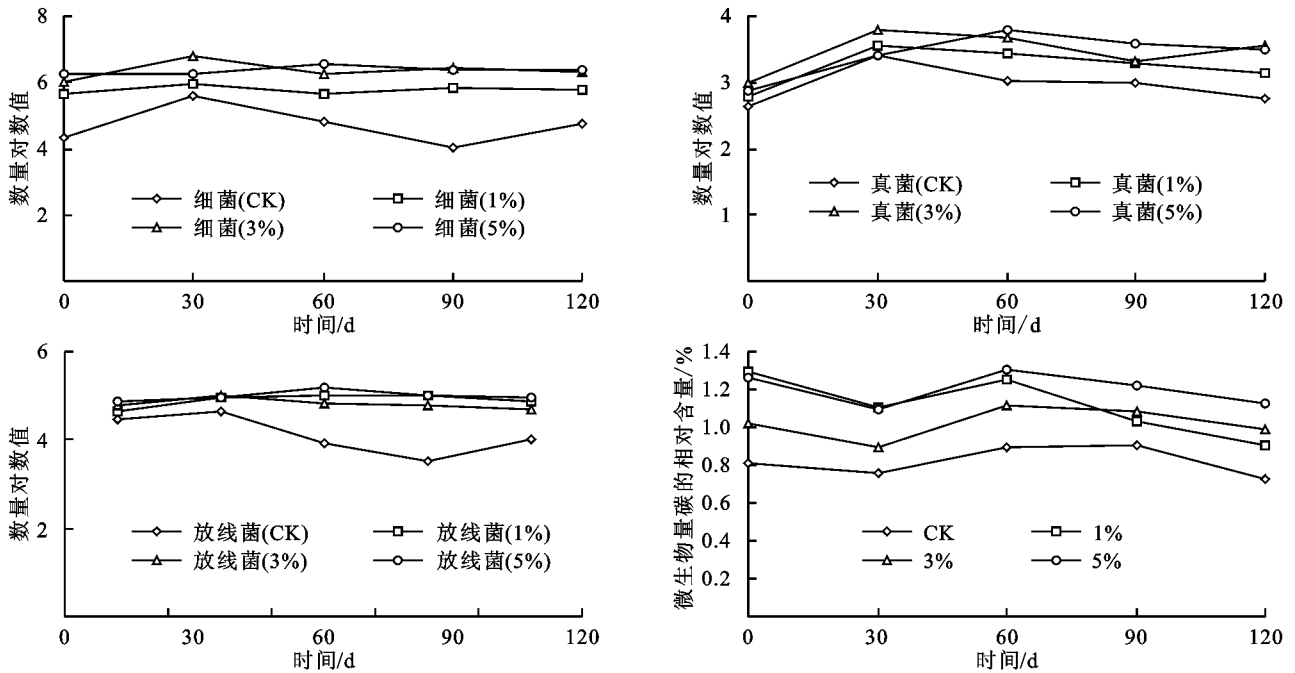


图 5 不同处理下微生物数量变化和微生物量碳的相对含量

(2) 整个培养期间,各处理 WSS 含碳量均表现为先降低后升高的趋势。

(3) 总体看来,白浆土中的枯草芽孢杆菌参与 HA 转化,促进 HA 的积累,但不参与 FA 的转化,在比例不同的条件下,转化的速度不同。

(4) 添加不同比例的菌体的各个处理对微生物的生长具有一定的影响,3%是多数土壤微生物生长较适合的处理条件;添加细菌菌体可以促进微生物量碳的形成,添加 1%细菌菌体的处理组微生物量碳的相对含量最高。

#### 参考文献:

- [1] 曾昭顺,庄季屏,李美平. 论白浆土的形成和分类问题[J]. 土壤学报,1963,11(2):111-129.
- [2] Tan K H. Environmental soil science[M]. CRC Press, 2009.
- [3] Waksman S A. Humus[M]. Baillière, Tindall & Cox, 1936.
- [4] Stevenson F J. Humus chemistry:genesis, composition, reactions[M]. John Wiley & Sons, 1994.
- [5] 崔俊涛. 微生物在土壤腐殖质形成与转化中作用的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2005.
- [6] 王菊花. 微生物对土壤腐殖质形成及结构的影响研究[D]. 长春:吉林农业大学,2007.
- [7] Mele P M, Crowley D E. Application of self-organizing maps for assessing soil biological quality[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2008,126(3):139-152.
- [8] Zhong W, Gu T, Wang W, et al. The effects of mineral

fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity[J]. Plant and soil, 2010,326(1/2): 511-522.

- [9] 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,1999:121-122.
- [10] 南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:136-142.
- [11] 吴金水,肖和艾. 土壤微生物生物量碳的表观周转时间测定方法[J]. 土壤学报,2004,41(3):401-407.
- [12] 沈萍,范秀界,李广武. 微生物学试验[M]. 北京:高等教育出版社,1999:86-89.
- [13] Hao X H, Liu S L, Wu J S, et al. Effect of long-term application of inorganic fertilizer and organic amendments on soil organic matter and microbial biomass in three subtropical paddy soils[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2008,81(1):17-24.
- [14] Lal R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security[J]. Science, 2004,304(5677):1623-1627.
- [15] Pan G, Li L, Wu L, et al. Storage and sequestration potential of topsoil organic carbon in China's paddy soils[J]. Global Change Biology, 2004,10(1):79-92.
- [16] Kalbitz K, Schwesig D, Schmerwitz J, et al. Changes in properties of oil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003,35(8):1129-1142.