

生物炭固定解鸟氨酸拉乌尔菌对紫色土磷钾有效性的影响

魏巍, 李婷*, 张廷锐, 金玮, 缪利, 李昌骏

(四川农业大学资源学院, 四川成都 611130)

摘要: 筛选能为解鸟氨酸拉乌尔菌 (*Raoultella ornithinolytica*, Ro) 提供适宜生存空间的生物炭, 探讨固定 Ro 的生物炭对不同性质紫色土磷 (P) 钾 (K) 有效性的影响。采用限氧裂解法分别在不同温度 (300 °C、500 °C 和 700 °C) 和原材料下 (玉米秆、小麦秆和稻壳) 制备生物炭。利用噻唑蓝 (MTT) 比色法筛选固定载体, 通过傅立叶变换衰减全反射红外光谱法 (ATR-FTIR) 表征其性能和结构; 采用室内土培试验探讨单施生物炭 (BC)、Ro 及固定 Ro 的生物炭 (Ro-BC) 对不同性质紫色土速效磷钾的影响。MTT 结果表明, 以热解温度 500 °C 的玉米秸秆炭 (MSC500) 为最佳载体; 红外光谱结果显示, 500 °C 玉米秸秆炭表面官能团的 C=C 和 -OH 的伸缩振动峰较明显, C-O-C 键伸缩振动峰加宽变深; 室内培养试验表明, 施入 Ro 和 Ro-BC 均可显著提高酸性、中性和石灰性紫色土速效磷、速效钾含量和细菌数量。以 Ro-BC 对土壤速效磷和细菌数量的提升效果最好, 提升效果分别达 61.1% ~ 276.3% 和 22.8% ~ 82.5%。但培养至 168 h 时, 速效磷出现下降趋势; 对速效钾而言, 酸性紫色土以 Ro 处理对其提升效果最好 (46.3%), 中性和石灰性紫色土则以 Ro-BC 处理提升效果最好 (29.8% 和 71.23%), 针对不同 Ro 筛选适宜的固定载体可提高 Ro 菌株活性, 改善土壤微环境, 进而有助于提高土壤磷钾有效性。

关键词: 生物炭; 植物根际促生菌; 固定微生物; 养分有效性

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0564-3945(2021)06-1330-09

DOI: 10.19336/j.cnki.trtb.2020102001

魏巍, 李婷, 张廷锐, 金玮, 缪利, 李昌骏. 生物炭固定解鸟氨酸拉乌尔菌对紫色土磷钾有效性的影响 [J]. 土壤通报, 2021, 52(6): 1330 - 1338

WEI Wei, LI Ting, ZHANG Ting-rui, JIN Wei, MIAO Li, LI Chang-jun. Effect of Biochar Immobilized *Raoultella Ornithinolytica* on the Availability of Phosphorus and Potassium in Purplish Soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2021, 52(6): 1330 - 1338

土壤磷 (P)、钾 (K) 是植物生长发育过程中所必需的矿质营养元素, 在提高作物产量和品质等方面发挥着重要作用^[1-2]。作为磷、钾肥消费大国, 我国年均磷肥 (P_2O_5) 和钾肥 (K_2O) 用量约为 2024 万 t 和 2640 万 t^[3]。然而, 施入土壤后的磷肥一方面在土壤的固持等作用下会转变为作物难以利用的固定形态, 导致作物对施入磷肥的当季利用率仅有 15% ~ 20%^[4-6]; 另一方面过量的磷肥施用会导致磷的流失产生水体富营养化等一系列环境问题^[7]。我国钾矿资源的匮乏以及传统重氮磷肥和轻钾肥的施肥习惯导致了钾肥用量不高, 从而导致土壤有效钾亏缺并成为提升作物产量和品质中的一个重要制约因素^[8-10]。土壤本身是蕴含着丰富的钾素, 但 90% ~

98% 存在于难溶性硅酸盐矿物中, 如何将土壤中难溶性磷和结构态钾转变成植物可吸收利用的有效磷钾是提升土壤生产力和保障国家粮食稳定供给的关键所在。

在土壤中存在着一类能将难溶的磷、钾元素分解转化为可供植物直接吸收利用养分的有益微生物, 被称为植物根际促生细菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), 它在植物根际中定殖, 通过释放有机酸来促进难溶态养分的溶解; 并分泌酶和抗生素等, 从而起到防治植物病害和提高植物对环境胁迫抗性的作用^[11-12]。近年来, 陆续有学者从水稻^[13]、番茄^[14]和高寒草甸^[15]等植物的根际分离筛选了多株 PGPR 菌株, 其中, 常见种群主要包括芽孢

收稿日期: 2020-10-11; 修订日期: 2021-01-22

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2021YJ0259) 和四川省科技创新 (苗子工程) 培育和小发明小创造项目 (2021094) 资助

作者简介: 魏巍 (1995-), 女, 四川省成都市人, 硕士, 主要从事土壤肥力及微生物研究。E-mail: Wwei4862@163.com

*通讯作者: E-mail: lt_sicau@163.com

杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属 (*klebsiella*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*) 等^[16-18]。然而, 由于养分来源短缺和土著微生物的优势竞争等因素影响, 直接将 PGPR 添加至土壤中会导致其大量死亡^[19]。因此, 部分研究将微生物固定到具有较大比表面积、高孔隙度和丰富官能团的生物炭材料上以提升其存活率^[20-22]。然而不同原料、热解温度和用量的生物炭对微生物的促生效应存在差异, 如 Liu 等^[23] 研究发现, 与来源于玉米芯、稻壳和竹子的生物炭相比, 由玉米秸秆制成的生物炭更有利于刺激钾溶性粘杆菌活性; Zhang 等^[24] 认为高热解温度下制成的生物炭对微生物数量具有负面影响。因此, 针对不同的 PGPR 种群, 需筛选不同生产条件下的生物炭以促进该菌株的存活率和活性。

紫色土是广泛分布于我国西南片区的土壤^[25], 受母质遗留因素影响, 紫色土本身磷钾含量较为丰富^[26-27]。但因土壤环境的异质性, 使得该土壤中的磷、钾素受到不同程度的淋失和耗竭, 以致土壤速效磷

和速效钾含量较低^[28-29]。本研究以对紫色土具有较强溶磷解钾能力的解鸟氨酸拉乌尔菌 (*Raoultella ornithinolytica*, Ro) 作为固定菌株, 立足于筛选不同性质的生物质炭, 以制备出最优固定 Ro 的生物炭复合材料, 探讨其影响不同性质紫色土磷钾有效性的部分机理, 以期生物炭固定微生物在实际生产与运用中提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 本实验菌种 Ro 从植物根际酸性紫色土中分离获得, 经鉴定为解鸟氨酸拉乌尔菌。

1.1.2 培养基 Luria-Bertani 培养基: 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 去离子水 1 L, pH 7.0~7.5; 牛肉膏培养基: 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 18~25 g, 去离子水 1 L, pH 7.4~7.6。

1.1.3 土样 于四川省雅安市雨城区农田采集的酸性、中性和石灰性紫色土, 其基本理化性状见表 1。

表 1 土壤基本理化性质
Table 1 Basic physical and chemical properties of soil

紫色土 Purplish soil	酸碱值 pH	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus (g kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus (mg kg ⁻¹)	全钾 Total potassium (g kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium (mg kg ⁻¹)	缓效钾 Slowly available potassium (mg kg ⁻¹)
酸性	4.08	19.77	0.19	3.69	7.25	31.09	128.66
中性	6.90	35.16	0.71	20.89	16.84	158.05	495.05
石灰性	8.56	21.64	0.82	9.01	21.39	130.67	296.34

1.1.4 载体材料 试验用生物炭原材料为玉米秸秆、小麦秸秆和稻壳。

1.2 方法

1.2.1 生物炭的制备 将玉米秸秆、小麦秸秆和稻壳三种原材料去除大颗粒杂质后, 经风干、粉碎过 2 mm 筛备用, 将材料放置于马弗炉内, 采用限氧裂解法以 15 °C min⁻¹ 分别热解升温至 300、500、700 °C 并热解 1 h, 保温 3 h, 随后计算热解前后产率和灰分含量。样品经冷却后以 0.5 mol L⁻¹ 的盐酸溶液淋洗, 并反复用去离子水润洗至中性即得到 300 °C、500 °C 和 700 °C 热解的玉米秸秆炭 (MSC)、小麦秸秆炭 (WSC) 和稻壳炭 (RHC), 烘干过 100 目筛备用。

1.2.2 固定 Ro 的复合材料的制备及最佳载体的筛选 将不同材料来源及热解温度的生物炭按 1% 的添加

量加入牛肉膏培养基, 121 °C 灭菌 15 min, 按照 5% 接种量接入 Ro 的种子液 (1*10⁸ cfu m⁻¹), 以 30 °C、180 r min⁻¹ 培养过夜。培养液经磷酸盐缓冲液反复洗涤并离心, 冷冻干燥后即固定 Ro 的生物炭复合材料, 于 4 °C 保存备用。分别取 300 °C、500 °C 和 700 °C 热解的 MSC、WSC 和 RHC 固定 Ro 的复合材料于无菌水中振荡至混匀, 并调整 OD₆₀₀ 值为 1, 采用噻唑蓝 (MTT) 法^[30] 测定滤液在 OD₅₁₀ 的吸光值, 从而间接反映细胞存活情况, 以筛选出负载该目的菌株的最佳生物炭载体。

1.2.3 生物炭固定 Ro 复合材料表征 本研究利用衰减全反射傅里叶变换红外光谱 (ATR-FTIR) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 观察生物炭固定 Ro 复合材料官能团的变化。取固定 Ro 的生物炭复合材料与溴化钾按 1:1000 混合, 充分研

磨后压片, 于波数范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 内扫描 64 次并叠加, 以获取复合材料官能团的伸缩振动和弯曲振动情况。

1.2.4 室内培养 将采自雅安老板山农田的 400 g 三种不同性质紫色土风干土装入 $6 \text{ cm} \times 14 \text{ cm}$ PVC 杯, 试验共设置: CK (加等量空白无菌水)、Ro、BC (1% w/w 生物炭^[31]) 和 Ro-BC (1% w/w 生物炭固定化 Ro) 4 个处理, 每组均为 3 个重复。用保鲜膜封住杯口并扎洞, 于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h、48 h、72 h、108 h、168 h、264 h 和 408 h 取样。

1.2.5 土壤样品采集及测定方法 将一部分采集土样经风干过 2 mm 筛后备用, 其中土壤速效钾按 10:1 水土比用 1.0 mol L^{-1} 中性 NH_4OAc 浸提, 火焰光度法测定; 酸性土壤速效磷采用 0.025 mol L^{-1} HCL 和 0.03 mol L^{-1} NH_4F 浸提, 碱性土壤速效磷采用 0.05 mol L^{-1} NaHCO_3 浸提, 钼锑抗比色法测定; 另一部分土样装入聚乙烯封口袋于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏, 用稀释涂布法测定土壤细菌数量。

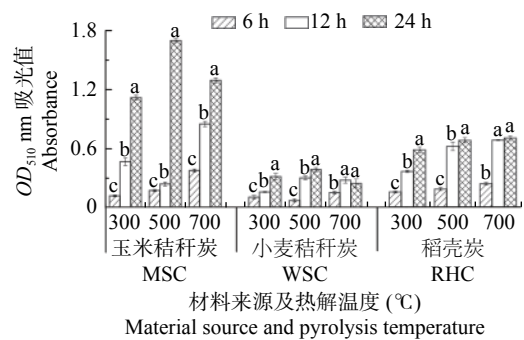
1.3 数据分析

采用 Excel 2010 进行描述性统计, 使用 SPSS.22 单因素法分析差异显著性和统计分析, 使用 Originpro 2020 作图。

2 结果与分析

2.1 固定 Ro 生物炭材料筛选及表征

2.1.1 固定 Ro 生物炭材料筛选 为探究不同温度和材料的生物炭对 Ro 细胞存活和提升效果, 分析了在 300、500 和 $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 热解温度下的 MSC、WSC 和 RHC 对 Ro 细胞存活的影响 (图 1)。结果表明, 不同热解温度的 MSC 固定 Ro 材料的甲胍生成率均随培养时间的增加而升高。截至 24 h, 以 MSC500 对甲胍的提升更为显著, 较 MSC300 和 MSC700 的分别增加了 52% 和 31.2%。不同热解温度的 WSC 固定 Ro 材料甲胍变化规律较 MSC 略有不同。WSC300 和 WSC500 的细胞数量均随着培养时间的增加而升高, 以 WSC 500 培养至 24 h 对细胞数量的促进效果更为显著, 较同一时间下的 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别高出 22.6% 和 58.3%。WSC700 的生物炭则在培养至 24 h 后略有降低, 细胞降低的数量较 12 h 并不显著 ($P > 0.05$)。RHC 固定 Ro 材料生成甲胍数量介于前两者之间。三种热解温度的 RHC 在不同培养时间均呈现逐渐增加的趋势, 不同的是以 RHC700 在 12 h 以后对细胞数量的提升效果不显著 ($P > 0.05$)。



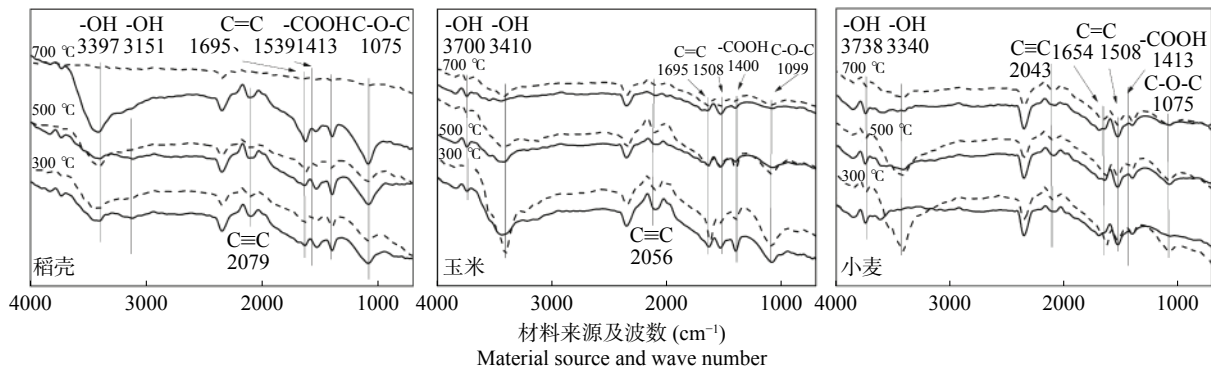
注: 同小写字母表示同一温度不同时间下 Ro 细胞甲胍生成数量差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 不同来源及热解温度生物炭对 Ro 菌株细胞生长的影响
Fig.1 Effects of biochars from various sources with different pyrolysis temperatures on the cell growth of Ro strain

不同性质生物炭以 MSC 为原材料的载体促进 Ro 生成的甲胍更多, 其甲胍生成率较 WSC 和 RHC 分别增加了 36% 和 147%。虽然以稻壳为原材料的生物炭也表现出对细胞的吸附能力, 但 MSC500 更能促进 Ro 的存活, 因此室内培养研究均采用 MSC500。

2.1.2 固定 Ro 生物炭材料表征 根据 ATR-FTIR 光谱中特征衍射峰的变化探究了三种热解温度下制备的 MSC、WSC 和 RHC 固定前后的官能团变化特征 (图 2)。结果表明, 不同热解温度下的 RHC 含有丰富的官能团结构, 包含了羟基 $\text{O}-\text{H}$ (3397 cm^{-1})、多环芳烃 $\text{C}=\text{C}$ (1695 cm^{-1}) 和炔烃 $\text{C}\equiv\text{C}$ (2079 cm^{-1}) 的伸缩振动, 以及木质纤维素等高分子聚合物 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (1075 cm^{-1}) 的振动吸收峰、碳酸盐中的 $\text{C}=\text{H}$ 伸缩振动以及芳香性 $-\text{CH}$ (799 cm^{-1}) 外弯曲振动。随着热解温度升高, 部分 RHC 的表面官能团有不同程度减弱, 以 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 键的减弱最为明显。固定 Ro 后的 RHC 较固定前, 未显著增加官能团的伸缩振动, 随着热解温度升高, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 键的吸收峰增强, 芳香化程度逐渐增加。

MSC 复合材料存在不同程度的强度变化、位移变化以及数量变化的趋势, 主要在 3700 、 3410 、 2366 、 2056 、 1612 - 1400 和 1099 cm^{-1} 等处有较明显吸收峰, 这一现象与 WSC 复合材料类似。MSC 复合材料在 $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 表面的 $\text{C}=\text{C}$ 键和 $-\text{OH}$ 键等较其余温度多, 表面高分子聚合物未完全分解, 相比 WSC 多了芳香性 $-\text{CH}$ (799 cm^{-1}) 外弯曲振动。随着热解温度升高, MSC 表面的羟基 $-\text{OH}$ 和芳香化程度先增高后减弱; 固定后材料的羧酸 $\text{O}-\text{H}$ 和炔烃 $\text{C}\equiv\text{C}$ 伸缩振动峰稍有增强, 且在 $1654 \sim 1075 \text{ cm}^{-1}$ 的多环芳烃 $\text{C}=\text{C}$ 和脂肪族 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 随热解温度升



注:虚线表示原始生物炭材料,实线表示固定 Ro 的生物炭复合材料

图 2 固定 Ro 前后生物炭材料全衰减反射红外光谱图

Fig.2 ATR-FTIR spectra of biochar materials before and after fixing Ro

高而增强,部分官能团有明显减弱,其中以含氧官能团-COOH 和-OH 的吸收峰减弱最为明显,脱水现象严重。

2.2 固定 Ro 的生物炭材料对土壤磷钾有效性的影响

2.2.1 固定 Ro 生物炭材料对土壤速效磷的提升效果

Ro 及其 Ro-BC 的施入均能提升三种紫色土速效磷 (O-P) 含量 (图 3)。截止第 408 h,以施入 Ro-BC

对酸性紫色土 O-P 提升效果最好,提升率达到 276.3%,另外对中性和石灰性紫色土提升效果分别达到 92.5% 和 61.1%。在 24~168 h 时, Ro 和 Ro-BC 处理下的酸性土 O-P 含量逐渐上升,168 h 相比 24 h 分别增加 8.6 mg kg⁻¹ 和 14.29 mg kg⁻¹,随后缓慢下降,可能存在部分有效磷被固定,而后在 408 h 时较 CK 分别显著高出 3.24 mg kg⁻¹ 和 9.81 mg kg⁻¹。

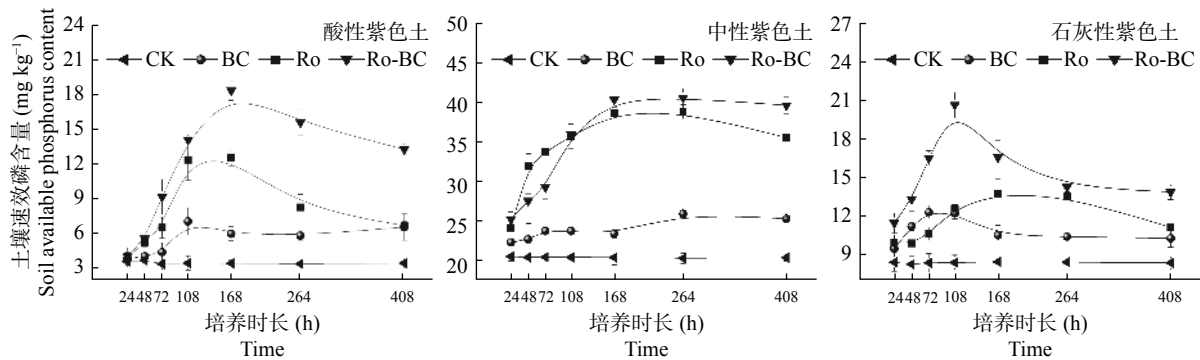


图 3 固定 Ro 生物炭对紫色土速效磷的影响

Fig.3 Effects of biochar immobilized Ro materials on the available phosphorus in purplish soil

中性紫色土中 O-P 的初始含量显著高于酸性紫色土 ($P < 0.05$)。第 24 h,各处理下的 O-P 含量比较差异不显著 ($P > 0.05$)。截至 72 h,以 Ro 处理下的 O-P 含量提升最快,其次是 Ro-BC,分别较 CK 提升了 74.1% 和 43.2%,随着培养时间延长到 408 h,两个处理又较 CK 分别显著提升了 72.7% 和 92.5% ($P < 0.05$)。石灰性紫色土的原始 O-P 含量较中性土低 11.86 mg kg⁻¹,各处理下的含量变化分两个阶段,到 24 h,仅有 Ro-BC 处理较 CK 显著高出 30.3%,48~108 h 之间,BC、Ro 和 Ro-BC 分别较 CK 高出 46.1%、50.7% 和 147.5%。到 408 h 时, Ro-BC 处理下的 O-P 含量略有下降但仍高出 CK 的

61.1%。酸性、中性和石灰性紫色土中,均以施 Ro-BC 对 O-P 的提升效果为最好,提升分别达到 276.3%、92.48% 和 61.1%。

2.2.2 固定 Ro 生物炭材料对土壤速效钾的提升效果 BC、Ro 及两者的协同施入均会提升三种紫色土中速效钾 (AK) 含量 (图 4)。第 24 h 时,BC、Ro 和 Ro-BC 处理下的酸性土 AK 含量相比 CK 分别显著提高了 6.5%、14.5% 和 23.3% ($P < 0.05$);随培养时间延长,BC 和 Ro 处理下 AK 含量呈现逐渐增加趋势,在第 408 h 时其 AK 含量分别达 41.21 mg kg⁻¹ 和 45.53 mg kg⁻¹,比 24 h 时提升了 24.6% 和 28%。Ro-BC 处理下 AK 含量则先显著增加,在第 72 h 时

达到最高值 (46.23 mg kg⁻¹), 随后逐渐降低, 在培养至 408 h 时其含量达到 38.81 mg kg⁻¹, 仅为 BC 和

Ro 处理的 94.2% 和 85.2%, 但仍比 CK 处理提升了 24.7%。

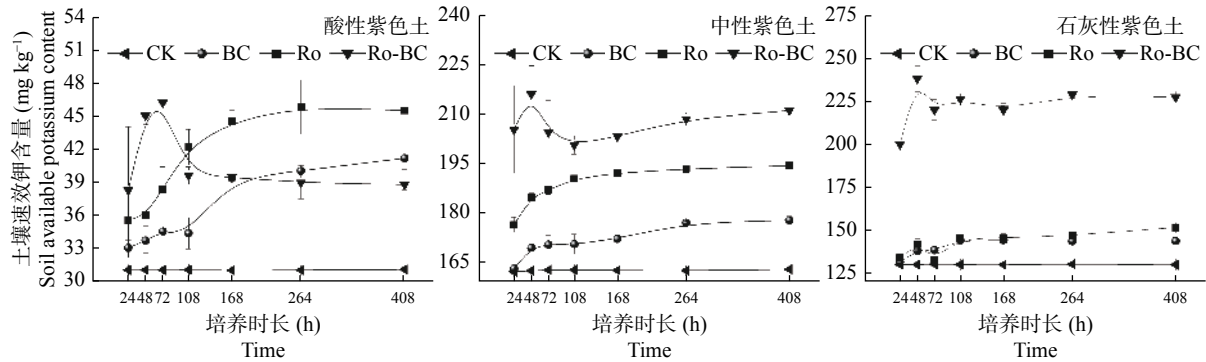


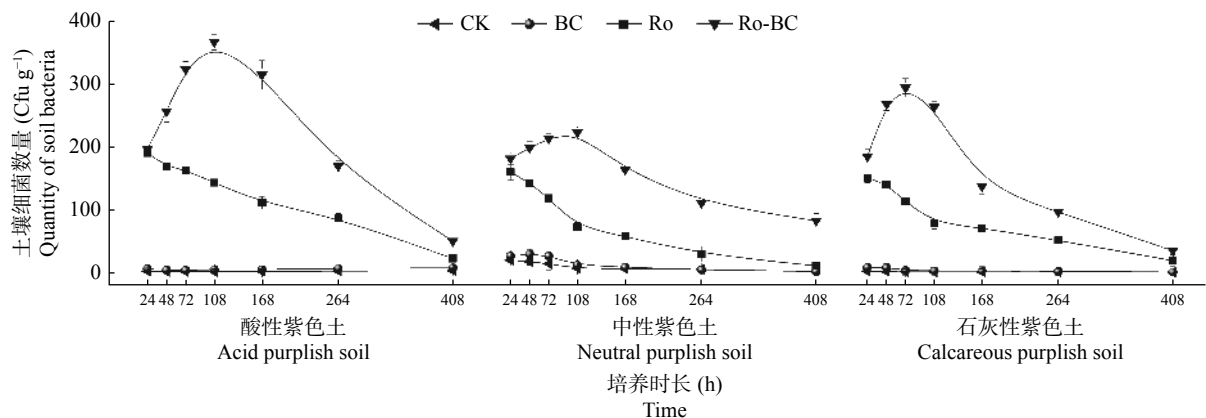
图 4 固定 Ro 生物炭材料对紫色土速效钾的影响
Fig.4 Effects of biochar immobilized Ro materials on the available potassium in Purplish soil

中性紫色土中 AK 的初始含量显著高于酸性紫色土 ($P < 0.05$)。Ro 和 Ro-BC 处理在第 24 h 时, AK 含量分别比 CK 显著增加了 9% 和 28.8%。当培养时间延长, BC 和 Ro 处理的 AK 含量逐渐递增, 而 Ro-BC 处理使得 AK 含量变化呈现波动态势。到 408 h 时, Ro-BC 处理下的 AK 含量达到 209.39 mg kg⁻¹, 相比 CK、BC 和 Ro 处理分别提升了 29.2%、20.1% 和 9.2%。不同时间下, 各处理下中性土 AK 含量高低顺序为: Ro-BC > Ro > BC > CK; 石灰性紫色土的 AK 含量比中性土低 27.3 mg kg⁻¹, 各处理下的含量变化趋势与中性土相近。随着培养时间达到 408 h, Ro-BC 处理下的石灰性土壤 AK 含量较 CK、BC 和 Ro 分别高出 94.62 mg kg⁻¹、83.16 mg kg⁻¹ 和 75.36 mg kg⁻¹。三种紫色土中, 酸性紫色土以单施 Ro 对 AK 提升效果最好, 提升幅度达到 46.3%; 中性和石

灰性紫色土以 Ro 和 BC 协同施用提升效果最好, 提升幅度分别达到 29.8% 和 71.23%。

2.2.3 生物炭固定化 Ro 对土壤细菌数量的影响 单施 Ro 及其与 BC 的协同施入均显著增加了三种紫色土中的细菌数量 ($P < 0.05$), 随着培养时间的延长, Ro 处理下的细菌数量逐渐降低, Ro-BC 处理下细菌的定殖规律则呈现先迅速增长, 后快速降低的趋势 (图 5)。在酸性紫色土中, Ro-BC 处理下土壤中细菌总数在培养第 108 h 时达到了 3.67×10^7 cfu g⁻¹, 相比同一时间在 BC 和 Ro 处理下其总数分别增加了 3.60×10^7 cfu g⁻¹ 和 2.23×10^7 cfu g⁻¹。培养第 408 h 时, Ro-BC 处理下的细菌总数降至 5.7×10^6 cfu g⁻¹, 但相比 CK、BC 和 Ro 仍分别高出 1225.3%、570.6% 和 140.9%。

中性紫色土室内培养结果表明, 在培养时间达



注: 酸性紫色土细菌数量表示为 10⁸ Cfu g⁻¹; 中性和石灰性紫色土表示为 10⁶ Cfu g⁻¹

图 5 生物炭固定化 Ro 对土壤细菌数量的影响
Fig.5 Effects of biochar immobilized Ro materials on the quantity of soil bacteria

到 108 h 时, Ro-BC 处理下的细菌数量相比 24 h 提升了 17.5%, 截至 408 h, 各处理间的结果仍为 Ro-BC 最高, 相较于 CK、BC 和 Ro 分别提升了 8×10^7 cfu g⁻¹、 8×10^7 cfu g⁻¹ 和 7.1×10^6 cfu g⁻¹。培养至 24 h 时的石灰性紫色土中细菌数量相较于酸性和中性, 在 Ro-BC 处理下分别多出 1.7×10^8 cfu g⁻¹ 和 3.8×10^6 cfu g⁻¹, 但在培养至 72 h 便达到峰值, 相较于同一时间的 Ro 增加了 1.8×10^8 cfu g⁻¹, 随着培养时间达到 408 h, 其数量迅速降到 2×10^7 cfu g⁻¹, 与 Ro 处理下的数量接近, 但仍比 CK 处理高了 1.8×10^7 cfu g⁻¹。三种紫色土中, 酸性紫色土以单施 Ro 对细菌数量提升效果最好, 提升达到 46.3%; 中性和石灰性紫色土以 Ro 和 BC 协同施用提升效果最好, 提升分别达到 29.8% 和 71.23%。

3 讨论

3.1 不同原材料及裂解温度生物炭对 Ro 固定性能的影响

筛选出不同材料来源和热解温度的生物炭固定载体, 是增加不同生境下微生物存活率的手段之一^[23]。本研究以成本低廉的农用废弃物为对象, 探究了不同来源和热解温度的生物炭对提升 Ro 存活率和负载度的影响, 确定了最优固定 Ro 的原材料为 MSC, 最适宜热解温度为 500 °C。当裂解温度为 300 ~ 500 °C 时, 生物炭呈现出富碳、比表面积、孔体积较高以及吸附性能最优的效果, 能为微生物提供良好的栖息场所和稳定的养分供给^[32]; 当热解温度高于 500 °C 时, 其中的纤维素、木质素等物质会降解为高度芳香化结构^[33], 生物炭的碳骨架结构和孔隙形状逐渐遭到破坏, 进而影响了微生物在孔隙中的存活^[34]。而 500 °C 下裂解的生物炭, 其中的芳香烃类物质、比表面积和孔隙结构均较高^[35-36], 这一说法印证了本研究的结论, 也与黄华^[37]的结论相似。根据 ATR-FTIR 的观察结果看 (图 2), 三种生物炭在 300 ~ 500 °C 下均存在 -OH 键、C=C 键和 -CH 键等的伸缩振动, 随着热解温度的升高, 固定前与固定后的复合材料表明官能团均存在不同程度减弱, 但 700 °C 的生物炭表面官能团却在 C=C 键和 C-O-C 键有明显增强, 其中的芳香碳结构组分增加。固定前后的 MSC 相较 WSC 和 RHC 的图谱更丰富且稳定, MSC500 复合材料表面的 C=C 键和 -OH 键等较其余温度多, 且 1099 cm⁻¹ 处的伸缩振动峰变宽变深, 表明此时的 MSC 表面还未完全脱水, 木质素、纤维

素等高分子聚合物还未完全分解, 这也与刘玉玲等^[38]的研究结论较为一致。

3.2 MSC 固定化 Ro 对土壤磷、钾有效性的影响

生物炭配施微生物菌剂后能显著减缓土壤养分的淋失、固定并适当增加土壤养分含量^[39]。室内培养结果表明, 单施 Ro 与施用生物炭固定 Ro 复合材料均对紫色土的 O-P 和 AK 有显著提升。在酸性、中性和石灰性紫色土中, 均以施 Ro-BC 对 O-P 的提升效果为最好, 提升分别达到 276.3%、92.48% 和 61.1%, 这是因为单施生物炭在环境中不易被直接分解, 24 h 对土壤养分的增加作用不显著^[36]; 同时已有研究表明生物炭的配施助其微孔隙结构为微生物的生存提供了适宜的空间和各类养分^[40]。本研究直接将菌株固定于生物炭, 这进一步提高了细菌的活性、并促进了生物炭养分的释放和难溶态养分的溶解^[41], 因此极大地提升了对于土壤有效磷钾提升效果。然而, 在没有外部养分消耗的前提下, 可能是土壤磷钾在循环过程中产生的固定^[42-43], 导致培养后期不同类型 O-P 和 AK 含量出现不同程度下降, 这与李寿田等^[44]研究结果类似, 外源磷肥施入不同土壤, 以酸性土壤在 24 h 的磷固定量最大, 而磷素在碱性土壤中固定量少于前者。单施 Ro 对酸性紫色土的 AK 提升效果最好, 提升幅度为 46.3%, 但对石灰性紫色土 AK 仅提升了 15.4%, 低于 Beheshti 等^[1]研究中单施溶磷菌对石灰性土壤 O-P 的提升效果 30.6%, 这可能是因为该菌株更适合在 pH 较低的环境中存活, 陈易等^[45]研究认为具有紫色土亲和性的功能菌与特定紫色土搭配能取得良好效果, 因此, 针对不同类型紫色土, 需添加更具亲和性的菌株以促进效用的发挥。本文结果中, 尽管 Ro-BC 复合材料的施入在三种性质紫色土中也存在养分固定行为, 但相比单施 BC 处理, O-P 和 AK 下降程度较弱; 相比单施 Ro 处理, 其对土壤磷素和钾素影响程度更深, 这与 Wu 等^[46]的研究结论一致, 因此, Ro-BC 复合材料更适于与紫色土区域土壤磷钾有效性的提升。

3.3 MSC 固定化 Ro 对土壤细菌数量的影响

相较于在土壤中单独施加微生物, 经载体固定后能显著提升微生物的存活率和活性^[47]。本文以 MSC500 的施入对显著提高细菌负载数量为最优, 李明等^[41]研究也得出 MSC500 对细菌数量的提升优于其余温度, 这是因为低温制备的生物炭会随着温度的升高而增加其管状孔隙, 进而提升了细菌的存活

率^[32-33]。不同处理中以单施 Ro 对酸性紫色土细菌数量提升效果最好,中性和石灰性紫色土则以 Ro-BC 复合材料的施入提升效果更好,提升顺序为石灰性 > 酸性 > 中性。单施 Ro 对石灰性和中性土壤的细菌数量提升效果较弱,这可能是因为该菌株筛选自酸性紫色土,因而对酸性紫色土适应性最好。但在中性和石灰性紫色土中,具有高孔隙度和丰富官能团的生物炭提升了 Ro 的环境适应性^[21],因而 Ro-BC 复合材料的施入对石灰性和中性土壤的细菌数量提升效果最佳。对比 Ro 在三种土壤中的存活情况和作用,我们认为应将具有相应土壤亲和性的微生物与之匹配,最大程度化利用其功能,而对于环境差异较大的土壤,则需要添加适当载体以广泛应用。

4 结论

本研究以生物炭为目标载体,探究了不同来源、热解温度的生物炭对提升 Ro 存活率的影响,确定了最优固定本 Ro 原材料为 MSC500。室内培养结果表明, Ro-BC 复合材料的施用可以显著提高酸性、中性和石灰性紫色土速效磷和速效钾含量,在培养后期会出现各处理之下土壤有效磷、钾被固定的问题,因此,需要进一步做作物种植试验以探究生物炭固定化细菌对土壤速效磷和速效钾长期和短期下的效应。

参考文献:

- [1] Beheshti M, Etesami H, Alikhani H A. Interaction study of biochar with phosphate-solubilizing bacterium on phosphorus availability in calcareous soil[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2017: 1 - 10.
- [2] 谭德水, 金继运, 黄绍文, 等. 不同种植制度下长期施钾与秸秆还田对作物产量和土壤钾素的影响[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(1): 133 - 139.
- [3] 李书田, 刘晓永, 何 萍. 当前我国农业生产中的养分需求分析[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(6): 1416 - 1432.
- [4] Kochian L V. Plant nutrition: Rooting for more phosphorus[J]. *Nature*, 2012, 488(7412): 466 - 467.
- [5] 张福锁, 王激清, 张卫峰, 等. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径. *土壤学报*, 2008, 45(5): 915 - 924.
- [6] 鲁如坤. 土壤-植物营养学原理和施肥[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
- [7] Elser J, Bennett E. Phosphorus cycle: A broken biogeochemical cycle[J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 29.
- [8] Ciceri D, Manning D A C, Allanore A. Historical and technical developments of potassium resources[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 502: 590 - 601.
- [9] He P, Yang L P, Xu X P, et al. Temporal and spatial variation of soil available potassium in China (1990 - 2012)[J]. *Field Crops Research*, 2015, 173: 49 - 56.
- [10] 张 磊, 张维乐, 鲁剑巍, 等. 秸秆还田条件下不同供钾能力土壤水稻、油菜、小麦钾肥减量研究[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(19): 3745 - 3756.
- [11] Li H Y, Qiu Y Z, Yao T, et al. Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings[J]. *Soil and Tillage Research*, 2020, 199: 104577.
- [12] Ijaz M, Tahir M, Shahid M, et al. Combined application of biochar and PGPR consortia for sustainable production of wheat under semiarid conditions with a reduced dose of synthetic fertilizer[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(2): 449 - 458.
- [13] Habibi S, Djedidi S, Ohkama-Ohtsu N, et al. Isolation and screening of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria from different rice cultivars in Afghanistan soils[J]. *Microbes and Environments*, 2019, 34(4): 347 - 355.
- [14] 邓振山. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(7): 0980 - 0988.
- [15] 高亚敏, 姚 拓, 李海云, 等. 高寒草甸嵩草、珠芽蓼根际优良植物根际促生菌的分离筛选及促生特性研究[J]. *草业学报*, 2019, 28(11): 114 - 123.
- [16] 刘少芳, 王若愚. 植物根际促生细菌提高植物耐盐性研究进展[J]. *中国沙漠*, 2019, 39(2): 1 - 12.
- [17] 刘丹丹, 李 敏, 刘润进. 我国植物根围促生细菌研究进展[J]. *生态学杂志*, 2016, 35(3): 815 - 824.
- [18] Weller D M, Thomashow L S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere[M]. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. 2007: 1-18.
- [19] Matz C, Kjelleberg S. Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing: Trends in Microbiology[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(7): 302 - 307.
- [20] 刘玉学, 吕豪豪, 石 岩, 等. 生物炭对土壤养分淋溶的影响及潜在机理研究进展[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(1): 304 - 310.
- [21] 王雪玉, 刘金泉, 胡 云, 等. 生物炭对黄瓜根际土壤细菌丰度、速效养分含量及酶活性的影响[J]. *核农学报*, 2018, 32(2): 370 - 376.
- [22] Gul S, Whalen J K, Thomas B W, et al. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions[J]. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 2015, 206: 46 - 59.
- [23] Liu S N, Tang W Z, Yang F, et al. Influence of biochar application on potassium-solubilizing *Bacillus mucilaginosus* as potential biofertilizer[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 47(1): 32 - 37.
- [24] Zhang G X, Guo X F, Zhu Y E, et al. The effects of different biochars on microbial quantity, microbial community shift, enzyme activity, and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil[J]. *Geoderma*, 2018, 328: 100 - 108.

- [25] 唐先干, 秦文婧, 李祖章, 等. 江西不同类型紫色土烤烟氮、磷、钾含量的规律研究[J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(5): 46 – 50 + 65.
- [26] 张会民, 徐明岗, 吕家珑, 等. 长期施肥对水稻土和紫色土钾素容量和强度关系的影响[J]. *土壤学报*, 2009, 46(4): 640 – 645.
- [27] 李庆召, 王定勇, 朱 波, 等. 川中紫色土旱坡地磷素的输出特征研究[J]. *水土保持学报*, 2004, 18(6): 97 – 99.
- [28] 王洪杰, 李宪文, 史学正, 等. 四川紫色土区小流域土壤养分流失初步研究[J]. *土壤通报*, 2002, (6): 441 – 444.
- [29] 曹瑞霞, 刘 京, 邓开开, 等. 三峡库区典型紫色土小流域径流及氮磷流失特征[J]. *环境科学*, 2019, 40(12): 5330 – 5339.
- [30] Mosmaan, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1–2): 55 – 63.
- [31] Hale L, Luth M, Kenney R, et al. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 84: 192 – 199.
- [32] 刘慧冉, 谢昶琰, 康亚龙, 等. 不同裂解温度对梨树枝条生物炭理化性质的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5): 895 – 902.
- [33] 韦思业, 宋建中, 彭平安, 等. 不同温度制备生物炭的热解产物特征[J]. *地球化学*, 2019, 48(5): 511 – 520.
- [34] Fu P, Yi W, Bai X, et al. Effect of temperature on gas composition and char structural features of pyrolyzed agricultural residues[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 8211 – 8219.
- [35] 简敏菲, 高凯芳, 余厚平. 不同裂解温度对水稻秸秆制备生物炭及其特性的影响[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(5): 1757 – 1765.
- [36] 叶协锋, 周涵君, 于晓娜, 等. 热解温度对玉米秸秆炭产率及理化特性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(5): 1268 – 1275.
- [37] 黄 华, 王雅雄, 唐景春, 等. 不同烧制温度下玉米秸秆生物炭的性质及对萘的吸附性能[J]. *环境科学*, 2014, 35(5): 1884 – 1890.
- [38] 刘玉玲, 朱虎成, 彭 鸥, 等. 玉米秸秆生物炭固化细菌对镉砷吸附[J]. *环境科学*, 2020, 41(9): 4322 – 4332.
- [39] Qian T T, Yang Q, Jun D C F, et al. Transformation of phosphorus in sewage sludge biochar mediated by a phosphate-solubilizing microorganism[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 359: 1573 – 1580.
- [40] AMELOOT N, SLEUTEL S, CASE SDC, et al. C mineralization and microbial activity in four biochar field experiments several years after incorporation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 195 – 203.
- [41] 李 明, 李忠佩, 刘 明, 等. 不同秸秆生物炭对红壤性水稻土养分及微生物群落结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(7): 1361 – 1369.
- [42] 杨文娜, 邓正昕, 李 娇, 等. 生物炭与化肥混合对氨挥发和磷固定的影响[J/OL]. *环境科学*: 1 – 14
2020-09-23]. <https://doi.org/10.13227/j.hjcx.202006068>.
- [43] Chatterjee D, Datta S C, Manjaiah K M. Fractions, uptake and fixation capacity of phosphorus and potassium in three contrasting soil orders[J]. *Journal of Soil Science & Plant Nutrition*, 2014, 14(3): 640 – 656.
- [44] 李寿田, 周健民, 王火焰, 等. 不同土壤磷的固定特征及磷释放量和释放率的研究[J]. *土壤学报*, 2003, (6): 908 – 914.
- [45] 陈 易, 程永毅, 郭 涛, 等. 一株具紫色土亲和性解钾菌的筛选及促生效应[J]. *西南大学学报 (自然科学版)*, 2016, 38(5): 58 – 65.
- [46] Wu F, Wan J, Wu S, et al. Effects of earthworms and plant growth –promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus, and potassium in soil[J]. *Journal of Plant Nutrition & Soil Science*, 2012, 175(3): 423 – 433.
- [47] 江 群, 杨 帆, 朱墨染, 等. 玉米秸秆生物炭固定化 *Acinetobacter lwoffii* DNS32性能研究[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(2): 382 – 386.

Effect of Biochar Immobilized *Raoultella Ornithinolytica* on the Availability of Phosphorus and Potassium in Purplish Soil

WEI Wei, LI Ting*, ZHANG Ting-rui, JIN Wei, MIAO Li, LI Chang-jun
(College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In order to screen the biochar (BC) that can provide suitable living space for *Raoultella ornithinolytica* (Ro), a series of biochar carriers were obtained by maize straw (MSC), wheat straw (WSC) and rice husk (RHC) under the oxygen limited conditions by 300 °C, 500 °C and 700 °C, respectively. The effects of BC, Ro and Ro-BC on the availability of P and K in purplish soil were explored by lab-incubation with the carriers by MTT colorimetric method and ATR-FTIR method. The results showed that MSC500 was the best carrier for Ro with an obvious stretching vibration peak by the functional groups of C = C and —OH, and the stretching vibration peak of C—O—C bond was widened and deepened as well. Moreover, the application of Ro and Ro-BC significantly improved the bacteria quantity and the availability of P and K in different purplish soils. Compared with the control, Ro-BC had the best effect on the bacteria quantity and Olsen-P, which increased by 61.1% ~ 276.3% and 22.8% ~ 82.5%, respectively. However, the Olsen-P was decreased after 168h incubated. For available K, the application of Ro had the best effect on acid purplish soil (increasing by 46.3%), while the application of Ro-BC had the best effect on the neutral and calcareous purplish soils (increasing by 29.8 % and 71.23 %, respectively). In general, suitable immobilized materials for different Ro could increase the activities of Ro strains, improving soil microenvironment to promote the availability of soil P and K.

Key words: Biochar; Plant growth-promoting rhizobacteria; Immobilized microorganism; Nutrient availability

[责任编辑: 张玉玲]