植物营养与肥料学报 2012,18(5):1277-1285
Plant Nutrition and Fertilizer Science

复合接种剂对三叶草生长特性和品质的影响

张 英[1,2], 姚 拓[1*], 朱 颖[1]
(1 甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,
甘肃兰州 730070; 2 青海大学农牧学院草业科学系,青海西宁 810016)

摘要: 利用从兰州地区红三叶(*Trifolium pratense* L.)和白三叶(*Trifolium repens* L.)根际分离、筛选获得的4株植物根际促生细菌(代号:A-Hsg、B-ls1-3、C-lhs11、D-lhs14)制作微生物接种剂,采用盆栽法测定不同接种剂处理对红三叶草生长特性及品质的影响。结果表明,本研究制作的接种剂符合《农用微生物菌剂》质量标准(GB 20287-2006)。复合接种剂处理AD对红三叶草株高、根长促进作用显著($P<0.05$),分别较对照增加33.62%和46.20%。AB和AD处理红三叶草地上植物量增重显著,较对照增加了101.69%和94.98%。BC和AD处理对地下植物量增加显著,增加了197.63%和151.18%。AC、AD和BCD处理后红三叶草整株磷含量均高于对照,其中BCD处理较对照差异显著($P<0.01$),磷含量较对照增加了15.38%。ABCD处理红三叶草整株的含氮量较对照达到了显著水平($P<0.05$),较对照增加了14.77%。ABD、BCD和ABCD处理均可提高红三叶草地上部分粗蛋白含量,其中处理ABCD粗蛋白含量较对照增加最多,增加了14.62%,达到了显著水平($P<0.05$)。复合接种剂AD、AB、BC、AC、ABD、BCD和ABCD接种后,对红三叶草生长特性和品质的提高表现出良好的促进效果,可作为复合菌肥材料作进一步研究。

关键词: 复合接种剂; 三叶草; 生长特性; 品质
中图分类号: S541+.2; S144.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2012)05-1277-09

Effects of compound inoculum on growth characteristics and quality of *Trifolium*

ZHANG Ying[1,2], YAO Tuo[1*], ZHU Ying[1]
(*1 College of Prataculture Science, Gansu Agricultural University/ Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education/ Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China;*
2 Department of Grassland Science, Agriculture and Animal Husbandry College, Qinhai University, Xining 810016, China)

Abstract: Four PGPR(Strain No.: A-Hsg, B-ls1-3, C-lhs11, D-lhs14) strains isolated and screened from the red clover (*Trifolium pratense*) and the white clover (*Trifolium repens*) in rhizosphere in Lanzhou were used to produce single or compound inoculum. A pot experiment was carried out to determine effects of the inoculum on growth character and quality of red clover. The results indicate that the produced inoculants are accorded with the quality criterion of agricultural microbial fertilizer of China(GB 20287-2006). The compound inoculant treatment, AD, has a significant effect on plant height and root length which are enhanced 33.62% and 46.20% respectively compared to the control ($P<0.05$). The compound inoculant treatments, AB and AD, could improve the aboveground biomass by 101.69% and 94.98% respectively comparing to the control ($P<0.05$), while the compound inoculant treatment, BC and AD, could increase underground biomass by 197.63% and 151.18% (P

收稿日期: 2011-11-08　　**接受日期:** 2012-04-20
基金项目: 国家自然科学基金项目(30960265); 甘肃省农牧厅生物技术专项(GNSW-2011-08); 现代农业产业技术体系(CARS-35); 甘肃省教育厅科研基地重点项目(08zx-08)资助。
作者简介: 张英(1977—),男,青海贵德人,副教授,博士研究生,主要从事草地微生物和植物根际促生菌的研究。
E-mail: zhangying2019@126.com。　*通讯作者 E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

<0.05) respectively. The phosphorous contents of the plants treated by the compound inoculants (AC, AD and BCD) are increased compared to control. Moreover, the compound inoculants (ABCD) enhances nitrogen content significantly (14.77%) compared to the control ($P<0.05$). Three treatments, ABD, BCD and ABCD, could improve the crude protein contents, and the crude protein content of the treatment of ABCD is improved by 14.26% compared to the control ($P<0.05$). Thus, the compound inoculants (AD, AB, BC, AC, ABD, BCD and ABCD) show good promoting effects on the growth and the quality of the red clover, and can be used as compound biofertilizer for the further study.

Key words: compound inoculant; *Trifolium pretense* L.; growth characteristic; quality

在农牧业生产过程中,化肥以施用效果明显、使用简便成为植物养分的重要来源。对世界范围内农牧业化肥的投入和植物产量进行分析,植物产量仅以算术级数增长,而化肥用量却几乎以几何级数增长。近年来,随着化肥使用量的不断增长,其负面影响日益明显,人们保护环境意识的逐渐增强及对无公害农产品、有机产品的日益重视,新技术、新产品研发不断深入,探寻新肥源(尤其是生物肥源)以部分替代化肥的研究引起了广泛的关注[1]。随着生物技术的不断发展,微生物肥料的研究与应用有了很大发展,新的微生物肥料品种不断出现,其中利用高效植物根际促生菌研制的新型微生物肥料已成为国内外生物菌肥研究的热点[2]。

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称促生菌或PGPR)指自由生活在土壤或附生于植物根际、茎叶,可促进植物生长及对矿质营养吸收和利用,产生促进植物生长代谢物,抑制有害微生物的有益菌类[3]。目前,国内外(特别是国外)学者已从一些作物和牧草根际分离筛选出大量高效优良的植物根际促生菌菌株,并且部分菌株已用于商业化菌肥生产,在农牧业生产中发挥着重要作用[4-6]。但植物根际促生菌的种类、特性不尽相同,并且菌株的促生功能的发挥、在植物根际的有效定植等受到气候环境、土壤类型、土著微生物、植物种类等因素的影响,因此制作的菌肥效果也差异很大[6-8]。人们也对细菌间的交互效应进行了一些研究,菌株混合,能起协同反应,促进了细菌、真菌、放线菌的繁殖,加速了土壤有机物质的分解与转化,提高菌株功能的发挥[9-13]。

红三叶(*Trifolium repens* L.)为豆科车轴草属[14]多年生牧草,又名红车轴草、红荷兰翅摇、金莱花、红花苜蓿等。红三叶草是优质的多年生牧草,同时又是良好的蜜源植物及绿肥植物,是优良的园林绿化及水土保持植物资源,植株中富含异黄酮类化合物,具有抗肿瘤(胃癌、乳腺癌),防治骨质疏松、改善更年期综合症等作用[15],是一种极有开发前景的天然药物,对于园林绿化、水土保持和水源涵养地建设、农村经济发展和农民增收等有着重要的意义。

目前,有关红三叶草根际促生菌研究国内外未见报道。本研究对前期[16-18]分离筛选的4株优良的PGPR细菌菌株制备单株和复合接种剂,同时通过盆栽试验进一步测定各接种剂对红三叶草生长和品质的影响,为探讨PGPR接种剂和复合菌肥的应用和推广提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

供试菌株为前期在兰州、定西、酒泉及周边自苜蓿(*Medicago sativa*)和三叶草(白三叶 *Trifolium repens* L.、红三叶 *Trifolium pratense* L.)植物根际分离获得的PGPR细菌菌株(见表1),这些菌株具有较强的固氮、溶磷、分泌IAA的能力,同时具有生长快、竞争力强等特点[16-17]。

1.2 PGPR菌悬液及接种剂制备

1.2.1 菌株拮抗反应测试 将供试菌株,分别两两交叉划线接种于LB[18]固体培养基上,置于28 ℃培养箱,培养4~8 d,并每天观察两细菌的交叉点的细菌生长情况,判断有无抑制作用,若交叉点细菌不生长或生长较差,说明两细菌间有拮抗作用,若交叉点细菌生长良好,则说明这两个细菌可以共存,各菌株间没有拮抗作用,不发生拮抗反应的菌株可以混合培养,否则只能单独施用。

1.2.2 PGPR菌株悬浮液制作 分别接种各优良PGPR菌株于LB[18]液体培养基中,于28 ℃,125 r/min培养48 h。待菌株充分生长后,用无菌水调节

表 1　供试菌株

Table 1　Tested strains

菌株代号 Strain No.	学名 Latin name	采集地点 Sample site	宿主植物 Host plant	分离部位 Fraction	功能 Function
Hsg	三叶草根瘤菌 Rhizobium trifolii	兰州 Lanzhou	苜蓿 *Medicago sativa*	根际土壤 Rhizosphere soil	溶磷、固氮 P solubilization, N fixation
ls1-3	待鉴定 Not identified	酒泉 Jiuquan	白三叶 *Trifolium repens*	根际土壤 Rhizosphere soil	溶磷 P solubilization
lhs11	待鉴定 Not identified	兰州 Lanzhou	红三叶 *Trifolium pratense*	根表土壤 Soil from root surface	溶磷 P solubilization
lhs14	待鉴定 Not identified	定西 Dingxi	红三叶 *Trifolium pratense*	远根土壤 Soil away from roots	溶磷、分泌 IAA P solubilization, Secreting IAA

各菌株菌悬液浓度为 1×10^8 cfu/mL(波长 660 nm, OD 值≥0.5)。经菌株拮抗反应测试无拮抗反应后,将制备好的菌悬液按表 2 的方法处理,试验共 16 个处理。待各混合菌株悬浮液充分生长后即可用于各 PGPR 接菌剂的制作。

1.2.3 接种剂制备　在每个 300 mL 的三角瓶内装入 150 mL LB 液体培养基,灭菌后置于室温下 1～2 d,经检查无污染后分别接种 20 mL 上述各菌悬液,于 28℃,125 r/min 培养 2～3 d,用灭菌量筒将菌液注入灭菌玻璃瓶中常温密封保存备用。

表 2　接菌剂的处理

Table 2　Inoculum treatments

序号 No.	处理代号 Treat. No.	菌株处理 Treatment of strains	序号 No.	处理代号 Treat. No.	菌株处理 Treatment of strains
1	A	Hsg	9	BD	lhs14 + lhs11
2	B	lhs14	10	CD	ls1-3 + lhs11
3	C	ls1-3	11	ABC	Hsg + lhs14 + ls1-3
4	D	lhs11	12	ABD	Hsg + lhs14 + lhs11
5	AB	Hsg + lhs14	13	ACD	Hsg + ls1-3 + lhs11
6	AC	Hsg + ls1-3	14	BCD	lhs14 + ls1-3 + lhs11
7	AD	Hsg + lhs11	15	ABCD	Hsg + lhs14 + ls1-3 + lhs11
8	BC	lhs14 + ls1-3	16	CK	不接菌的 LB 液体培养基 LB liquid medium of missed bacteria

1.3　PGPR 接种剂的质量检测

将制作的 PGPR 接种剂按不同保存时期取样,采用稀释平板计数法和显微镜观测法进行质量检测[19],测定接种剂的有效菌数和被污染情况。

1.4　PGPR 接种剂对三叶草生长和品质影响的测定

1.4.1 供试植物　红三叶(*Trifolium pratense* L.)由甘肃农业大学草业学院提供,发芽率为 93%。

1.4.2 试验设计　盆栽试验于 2010 年 3 月至 6 月在甘肃农业大学草业学院人工温室进行,光照模拟户外光照条件自动控制,试验期间室内温度变幅在 20～25℃之间,相对湿度在 40%～50%。栽培盆上口径 17 cm,盆底直径 13 cm,高 25 cm,每盆称取土样 2 kg, 过磷酸钙 2 g(磷肥的施用量按 120 kg/hm^2 过磷酸钙),混匀后装盆。盆栽土壤为: 土与营养土按 2∶1 比例混合,加入珍珠岩(混合土∶珍珠岩为 20∶1)和少量垃石。土壤基本理化性状按常规法测定[20],有机质含量 10.79 g/kg、全氮 1.76 g/kg、速

效磷 18.30 mg/kg、速效钾 194.88 mg/kg、pH 6.75。试验采用完全随机设计,按制备的接种剂设16个处理,每个处理3个重复。

1.4.3 接种及播种 选取饱满种子,取等量上述制备的接种剂(16个处理)浸种5 h后分别播种于花盆中。播种深度1～2 cm,每盆45粒种子。常规盆栽试验管理。出苗后,每盆定苗15株。

1.4.4 测定项目及方法 播种3个月后收获并及时测定株高(每盆随机测定10株,取平均值)、根长(每盆随机测定10株,取平均值)、地上生物量和地下生物量(每盆分别收获地上茎叶部分和地下根系部分,采用烘干法,于105℃杀青1 h,70℃烘干至恒重)[21];植株地上部和地下部的全磷含量采用氢醌亚硫酸钠法[20]测定,植株含氮量和粗蛋白含量用凯氏定氮法测定[20]。

1.5 数据处理

数据处理采用Excel和SPSS16.0软件,多重比较采用LSD法。

2 结果与分析

2.1 菌株拮抗反应测试

拮抗试验是鉴定菌株间遗传差异的传统方法,是其不同遗传特性和亲和群的重要表现[22]。本文供试菌株间拮抗反应测试结果表明菌株间均无拮抗反应,可用于复合接种剂的制作及互作方面的研究。

2.2 PGPR接种剂质量检测

接种剂的有效活菌数是接种剂质量优劣的重要指标。本研究制备的接种剂在室温下储存,经60 d,各处理有效活菌数在7.45×10^8 cfu/g以上,180 d时各处理有效活菌数不低于1.24×10^8 cfu/g,且无杂菌污染(如表3)。但在190 d时检测发现除处理BD和CD组合外,其余接种剂有效活菌数菌均低于《农用微生物菌剂》质量标准(GB20287-2006)要求,并有杂菌污染情况。

表3 接种剂质量检测结果

Table 3 Results of the inoculum quality examination

菌株处理代号 Treat. No.	时间 Time (d)							
	30		60		120		180	
	有效菌数 Eff. bacteria (cfu/g)	污染情况 Contam.	有效菌数 Eff. bacteria (cfu/g)	污染情况 Contam.	有效菌数 Eff. bacteria (cfu/g)	污染情况 Contam.	有效菌数 Eff. bacteria (cfu/g)	污染情况 Contam.
A	1.32×10^9	-	9.21×10^8	-	5.67×10^8	-	2.78×10^8	-
B	1.02×10^9	-	9.03×10^8	-	6.21×10^8	-	1.42×10^8	-
C	9.32×10^8	-	8.72×10^8	-	5.36×10^8	-	2.12×10^8	-
D	1.12×10^9	-	9.14×10^8	-	4.54×10^8	-	3.84×10^8	-
AB	9.54×10^8	-	7.45×10^8	-	4.34×10^8	-	2.04×10^8	-
AC	1.23×10^9	-	8.68×10^8	-	5.42×10^8	-	2.72×10^8	-
AD	1.25×10^9	-	8.84×10^8	-	5.71×10^8	-	3.68×10^8	-
BC	1.18×10^9	-	8.04×10^8	-	4.84×10^8	-	2.83×10^8	-
BD	1.20×10^9	-	9.07×10^8	-	6.34×10^8	-	4.14×10^8	-
CD	1.07×10^9	-	9.44×10^8	-	6.45×10^8	-	4.56×10^8	-
ABC	9.54×10^8	-	8.74×10^8	-	5.17×10^8	-	2.64×10^8	-
ABD	1.22×10^9	-	7.63×10^8	-	4.01×10^8	-	1.24×10^8	-
ACD	1.06×10^9	-	9.14×10^8	-	5.68×10^8	-	2.53×10^8	-
BCD	1.15×10^9	-	9.37×10^8	-	6.11×10^8	-	3.16×10^8	-
ABCD	1.26×10^9	-	9.64×10^8	-	5.82×10^8	-	2.81×10^8	-

注(Note):"-"表示无污染 Means uncontaminated.

2.3　PGPR 接种剂对三叶草生长的影响

2.3.1 对株高的影响　从表 4 可以看出,各处理红三叶株高较对照增加明显,且差异显著($P<0.05$),增加幅度为 7.52%～33.62%。其中 AD 处理对红三叶株高的促进作用达到了极显著水平($P<0.01$),较对照增加了 33.62%。说明单菌株或菌株组合制备的接种剂都能够对红三叶的株高产生一定的促进作用。

2.3.2 对根长的影响　各处理红三叶根长差异明显(表 4),达到了显著水平($P<0.05$),其中 D 处理效果较好,根长为 25.13 cm,较对照增加 52.43%。D 菌株与其他 3 个菌株 A、B 和 C 两两组合处理对红三叶根长的促进作用也较明显,分别较对照增加 46.20%、40.93% 和 40.04%,其中 AD 处理增加量最大。但也有部分组合对红三叶根长的增加量小于各单菌株处理,如 AB、BC 处理。说明,各处理对红三叶草根系的生长都有一定的促进作用,但影响的程度不同,这可能与菌株的功能有关。

2.3.3 对植株地上生物量的影响　从表 4 可以看出,各处理红三叶草植株的地上生物量较对照有不同程度的增加,除 ABD 处理外,各菌株处理均与对照差异显著($P<0.05$)。其中 AB 处理红三叶地上生物量最大,较对照增加了 101.69%,AD 处理次之,增加了 94.98%。D 处理无论单菌株接种,或与其他 3 菌株组合处理,红三叶地上生物量都较对照明显增加,其增加范围为 26.13%～94.98%。说明,部分菌株混合培养后,会产生协同作用,促进植株的生长,并增加其地上生物量。

2.3.4 对植株地下生物量的影响　表 4 显示,各处理均能不同程度提高红三叶草地下生物量,差异显著($P<0.05$)。其中 BC 处理效果最好,与对照相比地下生物量增加 197.63%,达到了极显著水平($P<0.01$),并与 B、C 单菌株处理相比,地下生物量增加了 64.45%、31.48%。AD 处理地下生物量增加次之,增加幅度为 151.18%。

2.4　对红三叶草养分含量及品质的影响

2.4.1 对植株磷含量的影响　表 5 结果表明,各处理红三叶草植株地上部、地下部分和整株磷含量高

表 4　各处理对红三叶生长及植物量的影响

Table 4　The effects of different treatments on the root, shoot lengths and biomass of red clover

处理 Treatment	株高(cm) Plant height	根长(cm) Root length	地上生物量(g/plant) Shoot biomass	地下生物量(g/plant) Root biomass
A	20.57 ±0.14 c	22.57 ±0.24 b	6.71 ±0.13 b	2.17 ±0.14 bc
B	21.78 ±0.17 b	21.78 ±0.23 bc	6.80 ±0.15 b	2.21 ±0.18 bc
C	21.95 ±0.15 b	20.03 ±0.20 c	8.26 ±0.20 a	2.86 ±0.15 b
D	22.53 ±0.20 ab	25.73 ±0.25 a	7.65 ±0.17 a	2.93 ±0.17 b
AB	21.23 ±0.18 bc	19.73 ±0.17 cd	8.74 ±0.22 a	3.16 ±0.19 ab
AC	21.32 ±0.14 bc	22.83 ±0.25 ab	7.09 ±0.18 b	2.78 ±0.17 b
AD	24.68 ±0.21 a	24.68 ±0.22 a	8.54 ±0.21 a	3.19 ±0.19 ab
BC	19.94 ±0.12 d	18.64 ±0.16 d	8.60 ±0.22 bc	3.78 ±0.21 a
BD	19.86 ±0.11 d	23.79 ±0.21 a	7.50 ±0.16 ab	2.94 ±0.16 b
CD	21.68 ±0.13 b	23.64 ±0.17 a	7.50 ±0.17 ab	2.55 ±0.14 b
ABC	21.16 ±0.15 bc	20.87 ±0.15 c	7.05 ±0.14 b	3.01 ±0.18 b
ABD	21.04 ±0.17 c	21.04 ±0.18 c	5.11 ±0.11 bc	1.87 ±0.07 c
ACD	23.47 ±0.18 a	22.47 ±0.16 b	7.42 ±0.13 ab	2.88 ±0.15 b
BCD	21.71 ±0.17 b	16.88 ±0.12 e	6.29 ±0.14 bc	2.23 ±0.09 bc
ABCD	21.73 ±0.16 b	18.64 ±0.15 d	6.12 ±0.13 bc	2.78 ±0.11 b
CK	18.47 ±0.14d	16.42 ±0.13 e	4.05 ±0.08 c	1.27 ±0.05 d

注(Note): 表中数值为各处理下的平均值 ± 标准差(M ± SD) Data are average values of replicates in each treatment ± standard division (mean ± SD); 同列数据后不同字母表示差异达 5% 显著水平($P<0.05$) Values followed by different letters in a column are significantly different at the 5% level.

低不同,有的处理间差异不显著,有的差异显著($P<0.05$),而有的达到了极显著水平($P<0.01$)。从三叶草整株的含磷量来分析,4个处理(A、AC、AD和BCD)均高于对照,其中A和BCD处理与对照差异显著($P<0.01$),磷含量较对照增加了6%和15.38%。菌株A及其组合处理中3个处理(A、AC和AD)磷含量较对照高,这可能与其本身是红三叶根瘤菌,更易适应根际环境状况,产生促生作用;而其他处理都呈相反作用,处理后红三叶草植株磷含量较对照低,这可能与其在红三叶根际的适应性或是红三叶本身吸收磷素作用有关。

2.4.2 对植株氮及粗蛋白含量的影响 从表5还可以看出,各处理对红三叶地上部、地下部和整株的氮含量均有影响。与对照相比,ABCD处理后红三叶地上部分氮含量增加最多,较对照增加了14.63%,差异显著($P<0.05$),CD处理次之,增加了7.35%。除BCD和C处理外,各处理对红三叶草地下部分氮含量均有促进作用,增加范围为0.13%~14.90%,其中ABCD处理含氮量较对照增加最多(14.90%),AD处理次之(13.45%)。各处理三叶草整株的含氮量差异较明显,A、B、AD、CD、ABD和ABCD处理的含氮量较对照差异达到了显著水平($P<0.05$),其他各处理的含氮量均低于对照,其中ABCD处理的含氮量与对照差异达到了极显著水平($P<0.01$),较对照增加了14.77%,CD处理次之,较对照增加了4.41%。植物地上部分粗蛋白含量的结果表明:A、CD、ABD、BCD和ABCD处理均可提高红三叶地上部分粗蛋白含量,其中,ABCD处理粗蛋白含量较对照增加最多,增加了14.62%,达到了显著水平($P<0.05$),CD处理次

表5 各处理对红三叶磷、氮及粗蛋白含量的影响(%)

Table 5 The effects of different treatments on phosphorus, nitrogen and crude protein contents of red clover

处理 Treatments	磷 Phosphorus			氮 Nitrogen			粗蛋白 Crude protein
	地上部 Shoot	地下部 Root	整株 Whole plant	地上部 Shoot	地下部 Root	整株 Whole plant	地上部 Shoot
A	0.29±0.01 ab	0.43±0.06 a	0.71±0.01 ab	3.14±0.08 bc	2.89±0.11 a	6.04±0.21 bc	19.65±0.31 bc
B	0.23±0.03 b	0.41±0.04 ab	0.64±0.03 c	2.97±0.11 c	3.06±0.06 a	6.04±0.19 bc	18.60±0.22 c
C	0.28±0.04 ab	0.31±0.01 c	0.58±0.04 d	2.87±0.13 c	2.24±0.08 b	5.12±0.15 e	17.96±0.14 c
D	0.27±0.02 ab	0.35±0.01 bc	0.62±0.01 c	2.94±0.07 c	3.02±0.17 a	5.97±0.16 bc	18.42±0.24 c
AB	0.24±0.03 b	0.38±0.03 b	0.62±0.01 c	2.88±0.06 c	2.82±0.06 a	5.70±0.13 cd	18.01±0.17 c
AC	0.26±0.07 ab	0.43±0.03 a	0.68±0.02 b	2.98±0.13 c	2.78±0.08 a	5.76±0.14 c	18.67±0.14 c
AD	0.29±0.16 ab	0.36±0.04 bc	0.66±0.08 bc	2.94±0.15 c	3.12±0.14 a	6.05±0.24 bc	18.42±0.16 c
BC	0.25±0.03 b	0.41±0.02 a	0.65±0.06 bc	2.68±0.05 c	3.09±0.17 a	5.78±0.11 c	16.79±0.12 c
BD	0.24±0.05 b	0.26±0.03 cd	0.51±0.02 e	2.86±0.06 c	2.89±0.12 a	5.76±0.15 c	17.93±0.11 c
CD	0.24±0.02 b	0.27±0.06 cd	0.51±0.03 e	3.39±0.01 b	2.76±0.05 ab	6.15±0.13 b	21.21±0.27 b
ABC	0.27±0.13 ab	0.22±0.03 d	0.49±0.06 e	2.79±0.14 c	2.79±0.07 a	5.59±0.16cde	17.49±0.21 c
ABD	0.28±0.04 ab	0.22±0.02 d	0.50±0.04 e	3.21±0.01 bc	2.87±0.04 a	6.09±0.24 bc	20.10±0.19 bc
ACD	0.24±0.01 b	0.37±0.01 bc	0.61±0.03 c	2.88±0.12 c	2.79±0.03 a	5.68±0.21 cd	18.04±0.15 c
BCD	0.31±0.03 a	0.44±0.01 a	0.75±0.01 a	3.18±0.17 bc	2.21±0.11 b	5.39±0.17 de	19.90±0.17 bc
ABCD	0.25±0.01 b	0.36±0.03 bc	0.62±0.04 c	3.59±0.13 a	3.16±0.14 a	6.76±0.20 a	22.50±0.31 a
CK	0.28±0.01 ab	0.37±0.04 bc	0.65±0.02 b	3.14±0.01 bc	2.75±0.01 ab	5.89±0.18 bc	19.63±0.13 bc

注(Note):表中数值为各处理下的平均值±标准差(M±SD) Data are average values of replicates in each treatment ± standard division (mean±SD);同列数据后不同字母表示差异达5%显著水平($P<0.05$) Values followed by different letters in a column are significantly different at the 5% level.

之,增加了 8.05%。

3 讨论

微生物接种剂作为一类农用活菌制品,其有效活菌数(CFU)是衡量其制品的重要指标,而其制品中的微生物的生存受许多环境因素的影响,如水分含量、pH 值、环境温度、载体性质、保存方式等。本试验制备的接种剂,保存半年时,除了 ABD 外其他接种剂的有效活菌数均不低于 2×10^8 个/g,杂菌率均小于或等于 20%,符合《农用微生物菌剂》质量标准(GB 20287-2006)要求。但保存时间超过半年后,大部分接种剂的有效活菌数均达不到质量标准(GB 20287-2006)的要求,故建议本试验制备的接菌剂在半年内使用完,或在后期施用时应加大接种剂量。本研究制备的接种剂,如何优化条件延长其优良接菌剂的使用有效期还需进一步研究。

牧草的生长特性受多种因素制约,其中能够直接反映牧草生长状况和牧草生产能力的指标有株高、根长、地上和地下植物量,另外,粗蛋白含量是反映牧草营养价值的重要指标,是饲草资源开发及其营养价值评定的主要依据。近年来,国内外学者就各种接种剂对植物的促生作用和品质的影响进行了大量的研究,如姚拓[23]等测定了燕麦接种固氮菌株后对其生长的影响及固氮量,结果表明接种不同供试固氮菌株对燕麦生长的影响不同,大多数菌株明显促进燕麦生长(株高、根长、根表面积和生物量),部分菌株则对燕麦生长影响不明显。席琳乔等[24]分别利用联合固氮菌株制作的接菌剂接种于燕麦,燕麦的株高、叶绿素含量、生物量及粗蛋白含量等都有不同程度的增加。韩文星等[25]利用从牧草根际筛选的优良促生菌株制作 PGPR 菌肥,并进行田间完全区组随机试验,研究其对燕麦生长和品质的影响,结果表明燕麦各生育期株高、地上植物量、地下植物量均明显高于对照,并能显著增加燕麦粗蛋白和粗脂肪的含量。张堃等[26]研究了不同剂型的联合固氮菌肥对青稞的促生效应和固氮能力的影响,结果表明不同剂型的联合固氮菌肥对青稞的株高、生物量、根冠比等都有促进效果。本研究制备的复合接种剂 AD、AB 和 BC 处理对红三叶草株高、根长、地上和地下部生物量的增加效果显著。

Oliveira 等[27]通过温室试验证明,水稻接种联合固氮菌 *Herbaspirillum* 和 *Azospirillum* 后的固氮百分率分别为 19% 和 47%。Yanni 等[28-29]将水稻根际分离的联合固氮菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*)接种于水稻,发现可显著增加粗蛋白的含量,并极显著地增加了子粒产量、子粒粗蛋白含量和水稻收获指数。Yanni 等[29]、Biswas 等[30]的研究发现,在田间接种联合固氮菌后可使总产量和氮素积累量分别增加 3.6 t/hm^2 和 19% ~ 28%。Karlidag[31]采用 *Bacillus* M3、*Bacillus* OSU-142 和 *Microbacterium* FS01 菌株,单独和混合接种苹果(*Malus domestica*) 5 年后,产量增加 26.0% ~ 88.0%,水果重量增加 13.9% ~ 25.5%,枝条长度增加 6.4% ~ 29.6%,枝条直径增加 15.9% ~ 18.4%。Orhan 等[32]采用 *Bacillus* M3 combination 和 *Bacillus* OSU-142 混合接种剂接种草莓,产量增加 74.9%,茎长增加 15.0%,叶片中的 N、P、K、Ca、Mg、Fe、Mn 和 Zn 含量增加,土壤中有效磷的含量从 1.55 mg/kg 增加到 4.71 mg/kg。本研究不同处理的接菌剂,对三叶草的株高、根长和生物量等生长指标都有不同程度的促进效应,而对三叶草品质(含磷量、含氮量和粗蛋白含量)的影响各不相同,部分可提高红三叶草的品质,也有部分接菌剂并非起到促进效应。不同的土壤类型、寄主植物、土壤中的含氮量、不同的接菌方式等诸多因素都可显著影响菌对寄主植物的促生效果[33]、固氮百分率及固氮量[34-35]。本研究制备的复合接种剂 AC、AD 和 BCD 处理后红三叶草整株磷含量均高于对照,ABCD 处理红三叶草整株的含氮量的增加效果显著,ABD、BCD 和 ABCD 处理均可提高红三叶草地上部分粗蛋白含量。所以,复合接菌剂 AD、AB、BC、AC、ABD、BCD 和 ABCD 接种后,对红三叶草生长特性和品质的提高表现出良好的促进效果,可望作为复合菌肥材料作进一步研究。本研究制备接种剂采用的部分菌株正在鉴定之中,对菌株的其他特性和接种剂的田间实际应用效果等将进一步研究。

参 考 文 献:

[1] 赵秉强, 张福锁, 廖宗文, 等. 我国新型肥料发展战略研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(5): 536-545.
Zhao B Q, Zhang F S, Liao Z W *et al*. Research on development strategies of fertilizer in China[J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2004, 10(5): 536-545.

[2] Tandon H L, Fertilizers S. Organic manures, recyclable wastes and bio-fertilizers[M]. New Delhi (India): Fertilizer Development and Consulation Organisation, 1992.

[3] Malik K A, Rakhshanda B. Association of nitrogen-fixing plant

growt hpromoting rhizobateria (PGPR) with kallar grass and rice [J]. Plant Soil, 1997, 194: 37-44.

[4] Hafeez F Y, Yasmin S, Ariani D *et al*. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer[J]. Agron. Sust. Devel., 2006, 26: 143-150.

[5] Suneja P, Dudeja S S, Narula N. Development of multiple co-inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants [J]. Arch. Agron. Soil Sci., 2007, 53(2): 221-230.

[6] Esitken A, Pirlak L, Turan M *et al*. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry [J]. Sci. Hortic., 2006, 110: 324-327.

[7] Yue H, Mo W P, Li C *et al*. The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton [J]. Plant Soil, 2007, 297: 139-145.

[8] Egamberdiyeva D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils [J]. Appl. Soil Ecol., 2007, 36: 184-189.

[9] 王富民，张彦，吴皓琼，等. 解磷固氮菌剂的研制及其对小麦的增产效应[J]. 生物技术，1994，4(4)：15-18.
Wang F M, Zhang Y, Wu H Q *et al*. Study of dissolve phosphorus and nittogen fixation bacterial manure as well as the effect of increase production for wheat[J]. Biotechnology, 1994, 4(4): 15-18.

[10] 刘丽丽，王金华. 磷细菌和钾细菌混合培养的研究[J]. 南开大学学报，1995，28(3)：21-25.
Liu L L, Wang J H. A study on the mixed culture of potassium bacteria and phosphorus bacteria [J]. Acta Sci. Nat. Univ. Nankaiensis, 1995, 28(3): 21-25.

[11] 王静，马玉珍，史清亮. 大豆根瘤菌与光合细菌混合接种效果[J]. 土壤肥料，1997，(2)：41-42.
Wang J, Ma Y Z, Shi Q L. Effect on mixed inoculation *Rhizobium fredii* and photosynthesis bacteria [J]. Soils Fert., 1997, (2): 41-42.

[12] 林启美，赵小蓉，孙焱鑫，等. 纤维素分解菌与无机磷细菌的相互作用[J]. 生态学杂志，2001，20(3)：69-70.
Lin Q M, Zhao X R, Sun Y X *et al*. Interaction between cellulose-decomposing microorganisms and inorganic phosphobacteria[J]. Chin. J. Ecol., 2001, 20(3): 69-70.

[13] 冯瑞章，姚拓，周万海，等. 溶磷菌和固氮菌溶解磷矿粉时的互作效应[J]. 生态学报，2006，26(8)：55-59.
Feng R Z, Yao T, Zhou W H *et al*. Studies on the interactions between phosphate-solubilizing bacteria and nitrogen-fixing bacteria in rock phosphate solubilization[J]. Acta Ecol. Sin., 2006, 26(8): 55-59.

[14] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海：上海科学技术出版社，1975. 1012-1013.
Jiangsu New Medical Academy. Chinese medicine dictionary [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1975. 1012-1013.

[15] Peter H M, Ronald B. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo[J]. Maturitas, 2002, 42: 187-193.

[16] 李玉娥，姚拓，朱颖，等. 兰州地区苜蓿和红豆草根际溶磷菌筛选及菌株部分特性研究[J]. 中国草地学报，2009，31(1)：45-50.
Li Y E, Yao T, Zhu Y *et al*. Isolation and characteristics of phosphorus-solubilizing bacteria in rhizosphere of alfalfa and sainfoin in lanzhou[J]. Chin. J. Grassland, 2009, 31(1): 45-50.

[17] 朱颖，姚拓，李玉娥，等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探[J]. 草地学报，2009，17(2)：259-263.
Zhu Y, Yao T, Li Y E *et al*. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their acting mechanisms in the rhizosphere of red clover[J]. Acta Agrestia Sin., 2009, 17(2): 259-263.

[18] Hafeez F Y, Malik K A. Manual on biofertilizer technology[M]. Pakistan: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering(NIBGE), 2000.

[19] GB 20287-2006.《农用微生物菌剂》质量标准[S].
GB 20287 - 2006. The agricultural microbial agents, quality standards[S].

[20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京：中国农业出版社，1999.
Bao S D. Soil chemical analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999.

[21] 南京农业大学. 土壤农化分析(第二版)[M]. 北京：农业出版社，1988.
Nanjing Agricultural University. Soil chemical analysis (Second Edn.)[M]. Beijing: Agriculture Press, 1988.

[22] 姚自奇，兰进. 杏鲍菇不同菌株生物学特性的研究[J]. 食用菌学报，2005，12(2)：14-18.
Yao Z Q, Lan J. Studies on the biological characteristics of different pleurotus eryngii strains[J]. Acta Edul. Fungi, 2005, 12(2): 14-18.

[23] 姚拓，蒲小鹏，张德罡，等. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究Ⅲ. 固氮菌对燕麦生长的影响及其固氮量测定[J]. 草业学报，2004，13(10)：101-105.
Yao T, Pu X P, Zhang D G *et al*. Associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Avena sativa* in an alpine region Ⅲ. Effect on *Avena sativa* growth and quantification of nitrogen fixed [J]. Acta Pratac. Sin., 2004, 13(10): 101-105.

[24] 席琳乔，姚拓，张德罡. 固氮菌对燕麦不同生育期促生作用的研究[J]. 草业学报，2007，16(3)：38-42.
Xi L Q, Yao T, Zhang D G. Effect of associative nitrogen fixation bacteria on *Avena sativa* growth[J]. Acta Pratac. Sin., 2007, 16(3): 38-42.

[25] 韩文星，姚拓，席琳乔，等. PGPR 菌肥制作及其对燕麦生长和品质影响的研究[J]. 草业学报，2008，17(4)：75-84.
Han W X, Yao T, Xi L Q *et al*. PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality evelopment[J]. Acta Pratac. Sin., 2008, 17(4): 75-84.

[26] 张堃，姚拓，张德罡，等. 高寒地区联合固氮菌肥对青稞的促生效应研究[J]. 植物营养与肥料学报，2010，16(3)：708-713.
Zhang K, Yao T, Zhang D G *et al*. Effects of associative

nitrogen-fixing biofertilizer on growth of *Hordeum vulgare* in alpine region[J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2010, 16(3): 708-713.

[27] Oliveira A M, Urquiaga S, Dobereiner J *et al.* The effect of inoculating endophytic N_2-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants[J]. Plant Soil, 2002, 242: 205-215.

[28] Yanni Y G, Rizk R Y, El-Fattah F K *et al.* The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots[J]. Aust. J. Plant Physiol., 2001, 28: 845-870.

[29] Yanni Y G, Rizk R Y, Corich V *et al.* Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trfolii* and rice roots and assessment of its potential to promote ricegrowth[J]. Plant Soil, 1997, 194: 99-114.

[30] Biswas J C, Ladha J K, Dazzo F B *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice[J]. Agron. J., 2000, 92: 880-886.

[31] Karlidag H, Esitken A, Turan M, Sahin F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple [J]. Sci. Hortic. 2007, 114: 16-20.

[32] Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin F. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry[J]. Sci. Hortic., 2006, 110: 38-43.

[33] Oliveira A L, de Canuto E L, Urquiaga S *et al.* Yield of micropropagated sugarcane plants[J]. Plant Soil, 2002, 242: 205-215.

[34] Okon Y, Labandera-Gonzalez C A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation [J]. Soil Biol. Biochem., 1994, 26: 1591-1601.

[35] Janes E K. Nitrogen fixation in endophytic and association symbiosis[J]. Field Crops Res., 2000, 65: 197-209.