

文章编号: 1001-1498(2008)01-0110-04

一种复合菌剂的培养保存与土壤接种试验

吴明¹, 邱晓力², 蒋科毅¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省微生物研究所, 浙江 杭州 310012)

关键词: 复合菌剂; 保存; 土壤接种

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Studies on Preservation and Soil Inoculation of a Kind of Mixed Bacterial Manure

WU Ming¹, QIU Xiao-li², JIANG Ke-yi¹

(1. Research Institute of Subtropical of Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Microbiology Institute of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China)

Abstract: A kind of mixed bacterial manure was prepared, which was composed of four bacterium, namely, *Bacillus megatherium* var *phosphaticum*, *B. mucilaginosus*, *Azotrhizobium* sp. and cellulose-decomposing microorganism. Preservation experiments of the mixed bacterial manure were carried out under different temperature conditions. The results showed that when the temperature was 4, 18 and 28 °C, the colony counts of each preserved bacterium increased until 30 days and then almost all of them began to decline, and the total colony counts of the bacterial manure varied little among 30 days and its growth curve reached a peak and a valley when the temperature was 4 and 38 °C respectively. This results suggested that the bacterial manure was optimum to be preserved at 4 °C and be kept for 30 days, and the conditions 4—28 °C and 10—90 days were the matched ranges for its preservation. Potting experiments showed that at room temperature and the amount of inoculation was 5‰, the growth curves of *Azotrhizobium* sp. and cellulose-decomposing microorganisms were very similar and both hadn't a great change, but that of *B. megatherium* var *phosphaticum* and *B. mucilaginosus* varied significantly with the increasing amount of inoculation. This suggested that at room temperature, the total colony counts of the bacterial manure would increase when the amount of inoculation was 5‰ and reached the highest value 90 days later after soil inoculation.

Key words: mixed bacterial manure; preservation; soil inoculation

随着纯培养技术的完善和对微生物互生和共生现象的研究,人工微生物混合培养或混合发酵已渐为人们所重视。混合菌是值得重视并应加强研究和利用的微生物资源^[1]。复合菌肥可以更有效地提高土壤肥力或对植物具有促生抗病作用,在农林业生产中已得到了广泛应用^[2-6]。有效菌含量是菌剂质

量的主要指标之一,因此有效菌的培养及保存在菌肥的应用过程中显得极为重要。国内对单一菌的培养和保存已有不少报道^[7-9],但对混合菌的培养、保存研究较少^[10-12]。

本研究进一步探讨了钾细菌、磷细菌、根瘤菌和纤维素分解菌4种微生物混合发酵制备的试验菌剂

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目“竹子商品林培育与可持续经营技术研究”(2001BA506B01)

作者简介: 吴明(1969—),男,浙江嵊州人,副研究员,主要研究方向为土壤生态学。

在不同温度、时间的交互保存,并对其进行了土壤接种试验,通过检验该混合菌剂的保存和施入林地后的一些特性,为复合菌肥的商品制备和施用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 磷细菌:巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium* var *phosphaticum* (Azomeg)),由浙江省微生物研究所提供;纤维素分解菌:采用由中国林科院亚热带林业研究所分离保存的 SF-1 菌株;钾细菌:采用自行分离纯化的胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus* Avakyan et al) 菌株;根瘤菌:固氮根瘤菌 (*Azorhizobium* sp.) 菌种,由浙江省微生物研究所提供。

1.1.2 菌剂培养基质 采用经过 45 d 堆制腐熟的猪粪商品有机肥(杭州萧山汇仁有机肥有限公司提供)为原料,添加质量分数为 3% 的玉米粉和适量水,混匀灭菌处理后备用。

1.1.3 供试土壤 接种培养用土壤采自浙江省龙游县,为砂岩发育的表层低丘红壤,风干磨碎后全部过 2 mm 筛。土壤基本理化性状为 pH 值 4.78,有机质 $15.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全 N $1.509 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全 P $0.486 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效 P $6.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效 K $66.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,代换性 Ca $535.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,代换性 Mg $50.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 试验设计

1.2.1 复合菌剂制备

1.2.1.1 扩大培养 钾细菌接种于硅酸细菌培养基斜面,根瘤菌、磷细菌和纤维素分解菌分别接种于一支细菌培养基斜面,28 条件下培养 24~36 h;然后将培养好的斜面取出转接于 500 mL 小摇瓶中,钾细菌接种于硅酸盐细菌培养液,其余 3 种菌混合接种于细菌培养液,每一摇瓶各装培养液 300 mL,接种量为每种菌各一满环,28 下摇瓶发酵 36 h;最后,分别将发酵好的 300 mL 菌液转接于 3 000 mL 大摇瓶中,各装培养液 2 000 mL,发酵条件同上。

1.2.1.2 肥料菌的固体发酵 经扩大培养后的发酵液均匀地混入基质中,拌匀后堆积约 20 cm 高,28~37 下固体发酵 3~4 d。培养的菌剂初始含水量为 32%,用于进一步保存和土壤接种试验。

1.2.2 复合菌剂保存试验 设置 4、18、28 和 38 4 个温度梯度,取发酵的菌剂 50 g 装入已灭菌的 100 mL 三角瓶中,每个温度设置 12 瓶,共 48 瓶。然后置于上述温度条件下,于 10、30、90、180 d 时,各取 3 瓶,分别测定每瓶混合样活菌数,取平均值。

1.2.3 土壤接种培养试验 取 5 kg 风干土壤装盆,加水约土壤最大持水量的 70%,每盆种植 1 株高约 30 cm 的竹苗,1 周后用已制备的复合菌剂进行接种,设 0.0 (CK)、1.0、5.0 $\text{g} \cdot (\text{kg} \pm)^{-1}$ 3 个水平处理,3 个重复,置室温下培养。分别在 10、30、90、180 d 时,每盆用管状取样器采集 3~5 cm 深度范围内土壤样品,混合后测定活菌数。

1.3 菌落数测定方法

采用平板稀释分离技术,选取菌落数为 30~300 的平板作为菌落计数标准,每一稀释度采用 2 个平板菌落的平均数乘以稀释倍数进行菌落计数。

2 结果与分析

2.1 复合菌剂保存试验结果

图 1 表明:在 18、28 条件下,根瘤菌、磷细菌和纤维素分解菌 3 种肥料菌的含菌量随保存时间的变化其高低顺序基本保持一致,含菌量顺序为:30 d > 10 d > 90 d > 180 d;而钾细菌 4 条件下最大含菌量出现在 90 d 时;30 d 时不同温度下含菌量高低顺序为:4 > 18 > 28 > 38。

在 4、18、28 条件下,4 种肥料菌含菌量随时间的推移而呈现出增长的趋势,除钾细菌含菌量在 4 时直至 90 d 到达最大值外,其余均在 30 d 时达到最高值,之后出现了大幅下降,保存 30 d 可得到高含菌量的菌剂。在 38 条件下,根瘤菌和纤维分解菌含菌量在 10 d 即达到了最大值,其后含菌量开始下降;钾细菌含菌量在 30 d 之前随时间呈现增加趋势,之后下降;磷细菌含菌量在 30 d 之前保持不变,其后开始减少,保存 10 d 后可得到高含菌量的菌剂。4 条件下保存的菌剂与其它 3 个温度相比,总体含菌量是最高的,30 d 内肥料菌的含菌量呈逐渐上升趋势,在该温度条件下可以较大程度地维持菌种的高活性状态。在同样保存 30 d 条件下,随着温度的升高,试验样品的含菌量逐渐减少,28 条件下保存的菌剂其含菌量比 18 时平均减少 42.2%,38

时降至最低。

试验表明,该种菌剂的最佳保存时间为 30 d,最长保存时间为 90 d;最佳保存温度为 4 ℃,适宜保存

温度为 4~28 ℃。在 4~28 ℃ 条件下保存,10~90 d 内菌剂含菌量能保持较高水平。

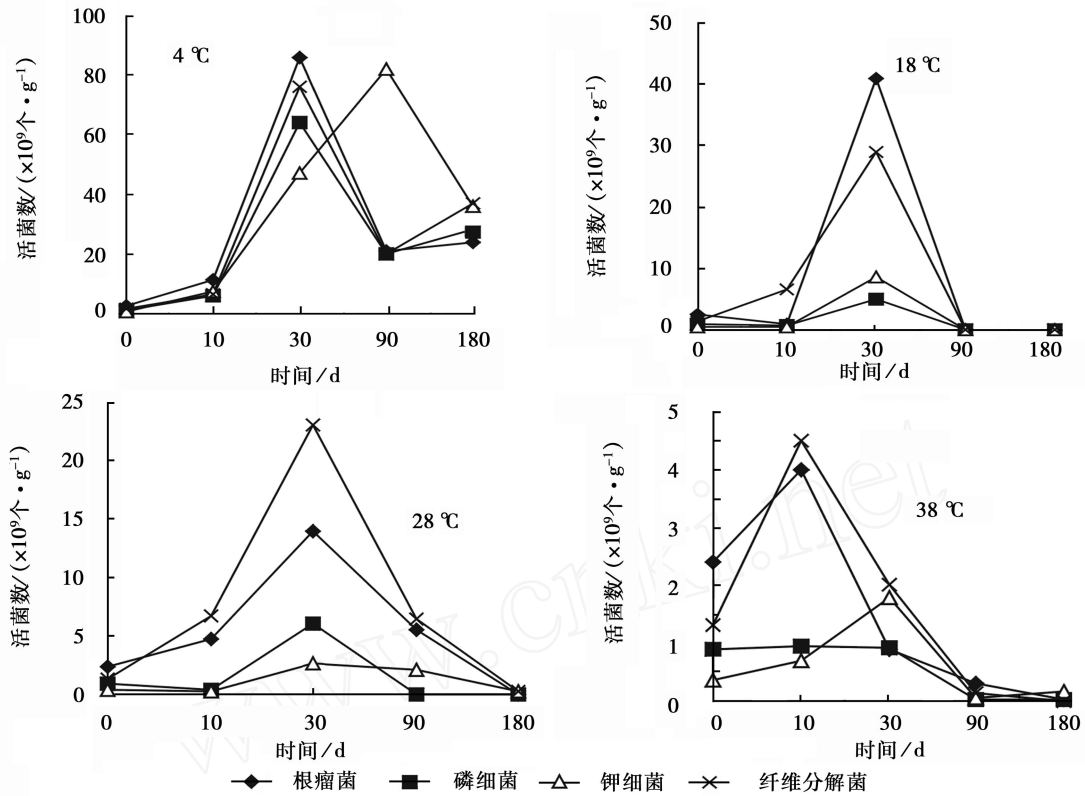


图 1 保存温度、保存时间对活菌数的影响

2.2 土壤接种定殖试验

土壤接种试验结果显示,除纤维素分解菌活菌量在定殖 180 d 接种量 1% 时出现比 5% 条件下更高外,该复合菌剂中其它 3 种菌株在不同的定殖时间都随着接种量的增加而增加。

由图 2 可见:在接种量 1% 时,根瘤菌和钾细菌生长曲线较为一致,均出现 2 个高峰,纤维素分解菌为单峰,且 3 种肥料菌生长高峰期都集中在 90 d 左右;磷细菌的生长曲线高峰在接种定殖 10 d 时出现。与接种量 1% 时相比,在接种量为 5% 时,根瘤菌和纤维素分解菌的生长曲线总体趋势都变化不大,活菌量高峰期仍出现在 90 d 左右,但纤维素分解菌高峰期活菌量有了较大幅度的增加;磷细菌和钾细菌的生长曲线都有较大变化,在接种量增加条件下二者的生长曲线呈现了相反的变化趋势:接种量的增加导致磷细菌的生长曲线高峰推迟到来,从 10 d 增加到 30 d;而钾细菌的生长曲线则与其相

反,高峰提前到 30 d 左右出现,高峰期也延长为 10~90 d 左右,两种细菌的活菌量都有了较大幅度的增加。

试验表明:在室温条件、接种量低于 5% 时,该菌剂中活菌数随着接种量增加具有增加的趋势,且活菌量高峰期出现在 90 d 左右。

刘丽丽等^[10]研究表明:磷细菌和钾细菌的混合培养并不影响彼此的解磷、解钾活动;而蒲一涛等^[11]研究发现,固氮菌和纤维素分解菌混合培养的活菌数及含氮量均高于两种菌株各自单独培养,并认为自生固氮菌和纤维素分解菌可以进行混合培养并做成混合菌剂。这表明该混合菌剂的菌种配置是合理的,结合本研究结果,为了获得更高的活菌量,同时更好地促进根瘤菌和纤维素分解菌协同作用,该混合菌剂的接种量可以尝试适量增加,或者提高该菌剂制备过程中根瘤菌和纤维素分解菌的含菌量和比例。

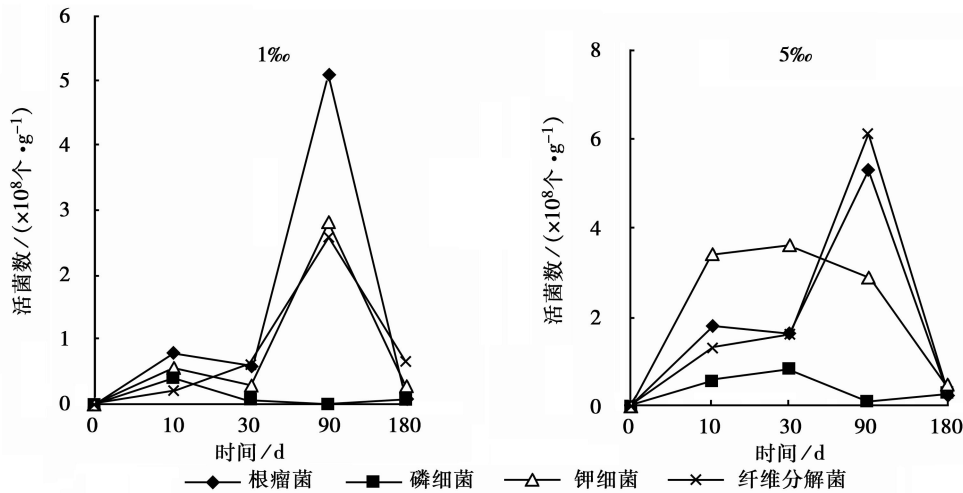


图 2 不同接种量下土壤中 4 种菌种生长 (活菌净增值量) 变化

3 小结

(1) 复合菌剂的有效保存与保存时间密切相关。在 0~28 条件下, 钾细菌、磷细菌、根瘤菌和纤维素分解菌 4 种肥料菌含菌量 30 d 内随时间的推移而呈现出增长的趋势, 除钾细菌含菌量在 4 时直至 90 d 达到最大值外, 其余均在保存 30 d 时达到高峰, 30 d 后含菌量出现较大幅度下降; 在 38 条件下, 除钾细菌含菌量高峰保持不变, 其余 3 种高峰均提前到 10 d。初步认为该种菌剂的最佳保存时间为 30 d, 最长保存时间 90 d。

(2) 温度条件对复合菌剂的有效保存影响较大。在 4 条件下保存菌剂时, 各菌种含菌量是最高的, 随着温度的升高, 含菌量逐渐减少, 38 时降至最低。该种菌剂最佳保存温度为 4, 适宜保存温度为 4~28。

(3) 该复合菌剂经土壤接种后, 磷细菌的土壤增殖效率较低, 4 种菌株总体上定殖、增殖作用明显, 初期土壤含菌量随接种量增加而增加。除磷细菌外, 1% 和 5% 的土壤接种处理都在 90 d 时达到最大的活菌数。

(4) 复合菌剂的含水量可能对试验结果产生较大的影响, 本试验只是 32% 的初始含水量时的数据, 有待于进一步增加实验, 提出该类复合菌剂最佳的含水量范围。

(5) 由于混合发酵中各菌种的最佳培养条件, 包括培养基 C/N、温度、湿度和发酵时间等都存在一定的差异, 各菌种之间交互作用也复杂多变, 本试验

只是对混合发酵的初步探讨, 对多菌种混合发酵条件及其过程机理有待于进一步研究, 以形成相对完善可靠的发酵工艺。

参考文献:

- [1] 冯 树, 张忠泽. 混合菌——一类值得重视的微生物资源 [J]. 世界科技研究与发展, 2000, 22(3): 44 - 47
- [2] 胡正嘉, 沈福初, 秦万贵, 等. 丛枝菌根真菌和细菌肥料对水稻生长的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 246 - 247
- [3] 杨承栋, 焦如珍, 孙启武, 等. 细菌肥料促进马尾松生长效应的研究 [J]. 林业科学研究, 2002, 15(3): 361 - 363
- [4] 武红霞, 邬飞波, 张国平. 不同肥料处理对麦绿素专用大麦嫩叶产量和品质的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(4): 432 - 436
- [5] 陈志新, 郭思琪, 吕丽蓉, 等. 森林苗圃专用复合菌剂的应用研究 [J]. 林业实用技术, 2003(8): 15 - 17
- [6] 刘洪亮, 赵风梅, 黄 琴. [J]. 中国棉花, 2005, 32(2): 25 - 26
- [7] 杨启银, 陈育如. 菌肥用光合菌在纤维素水解液中的培养 [J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2001, 24(3): 83 - 87
- [8] 吴洪生, 石光辉, 陈佳宏, 等. 钾细菌制剂不同剂型对存活菌数的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 565 - 567
- [9] 吴红慧, 周俊初. 根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 14 - 19
- [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: 自然科学版, 1995, 28(3): 21 - 25
- [11] 蒲一涛, 钟毅沪, 郑宗坤. 混合培养对固氮菌和纤维素分解菌生长及固氮的影响 [J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(1): 1 - 4
- [12] 耿金菊, 刘登如, 华兆哲, 等. 好氧脱氮微生物的混合培养条件 [J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 78 - 82