

张双凤,张爱民,张瑞英,等.高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的影响及保水生物肥料的研制[J].江苏农业科学,2013,41(7): 325-327.

高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的影响及保水生物肥料的研制

张双凤¹,张爱民^{1,3},张瑞英²,赵钢勇¹,张克洪¹

(1.河北大学生物技术中心,河北保定 071002; 2.河北大学生命科学学院,河北保定 071002;

3.河北农业大学植物保护学院,河北保定 071000)

摘要:为了研制具有保水作用的生物肥料,研究了高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌的影响,并用先将胶冻样类芽孢杆菌发酵液制成颗粒再与高吸水树脂混合的方法研制出保水生物肥料。结果表明:高吸水树脂在平板和液体条件下对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株均具有抑制作用,在检测培养基平板上添加高吸水树脂后计数胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 发酵液含菌量,培养 48 h 后 HX-02 菌株的含菌量由 5.6×10^8 CFU/mL 降低到 1.6×10^8 CFU/mL;在液体摇瓶中添加高吸水树脂,抑制了胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株芽孢的形成,培养 47.5 h 后,菌体细小,而不添加高吸水树脂,培养 47.5 h 后,全部形成芽孢,含菌量达到 9.5×10^8 CFU/mL。通过将胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株与草炭制成颗粒,再与高吸水树脂按一定比例进行混合制成保水生物肥料,其理化指标、无害化指标和技术指标均符合 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》的规定;将该产品室温保存 360 d,含菌量由初始的 2.57×10^8 CFU/g 降到 2.23×10^8 CFU/g,降低幅度为 0.34×10^8 CFU/g,芽孢的存活率为 86.8%,吸水倍率为 25.6,基本保持不变,解决了高吸水树脂与胶质芽孢杆菌不能共存的问题,研制出了保水生物肥料。

关键词:高吸水树脂(SAP);胶质芽孢杆菌 HX-02;抑制作用;芽孢存活率;保水生物肥料

中图分类号: S144 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0325-03

高吸水树脂(SAP)是一种具有超高吸水保水能力的高分子材料,特性是不溶于水,但能吸收大量的水,与水接触时短时间内溶胀且凝胶化,最高吸水能力接近千倍于自身重量^[1]。高吸水树脂最先在 20 世纪 70 年代末由美国农业部北方研究中心研制成功,并大量应用于土壤改良及荒漠化治理。20 世纪 80 年代中后期,中国农业科学院引进并进行保水性能的应用试验,德国、法国、比利时、日本等国家开始进行规模化生产,并广泛应用于农林、园艺、石油开采及医用卫生^[2-3]等行业。20 世纪 90 年代初,我国在部分地区进行试验示范,在防沙造林、土壤改良和保水增产等方面取得了一定的成绩^[4-5]。

胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株是河北大学农业生态与环保研究室科研人员从河北省保定市高阳县红薯土壤中分离筛选的具有高解硅、解钾活性,对土壤多种矿物质具有释放功效及对多种土壤病原微生物有拮抗活性的胶冻样类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*),由于该菌株具有较高的解硅能力,因此俗称硅酸盐细菌。硅酸盐细菌可以通过其生命活动过程中所产生的有机酸和无机酸直接或间接破坏硅酸盐矿物

的晶格结构,使土壤中固定的钾元素释放出来,将无效钾转化为有效钾,有研究证明该细菌不仅可以转化土壤中的无效钾,同时还可以转化土壤中磷、镁、铁、硅等微量元素,能明显改善植物氮、磷、钾及某些微量元素的营养水平,从而提高作物产量,改进作物品质^[6-8]。

我国大量田间应用试验结果表明,胶冻样类芽孢杆菌应用于农业生产中具有显著的经济效益、生态效益和环境效益^[9],而高吸水树脂在农业生产上应用与推广,可在农作物保苗、抗旱及水土保持等方面发挥巨大效能,从而大幅度地提高我国农业的经济效益^[10]。为了开发一种新型保水微生物肥料,需要将高吸水树脂与微生物肥料有机地结合在一起,本研究对此进行了初步研究和探讨,为保水微生物肥料的研制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 高吸水树脂 河北海明生态科技有限公司提供,白色晶体颗粒。

1.1.2 胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株 河北大学生物技术中心保藏菌株。

1.1.3 培养基 检测培养基:蔗糖 5.0 g/L,磷酸氢二钠 2.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,氯化钙 0.1 g/L,三氯化铁 0.005 g/L,琼脂 18.0 g/L,pH 值 7.5~8.0。

含高吸水树脂(SAP)的检测培养基:蔗糖 5.0 g/L,磷酸氢二钠 2.0 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,氯化钙 0.1 g/L,三氯化铁 0.005 g/L,高吸水树脂 2.0 g/L,琼脂 18.0 g/L,pH 值 7.5~

收稿日期:2012-12-24

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:062071250-2)。

作者简介:张双凤(1966—),女,山西原平人,硕士,实验师,主要从事农业微生物菌种的分离及发酵工艺研究。Tel:(0312)5079734; E-mail:wszhangshuangfeng@163.com。

通信作者:张爱民,博士研究生,副研究员,主要从事农业微生物领域的基础和应用研究工作。E-mail:zhangam2008@yahoo.com.cn。

8.0。

一级摇瓶培养基:蔗糖 10.0 g/L,硫酸铵 1.0 g/L,磷酸氢二钾 0.2 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,三氯化铁 0.005 g/L,碳酸钙 0.5 g/L,酵母汁 0.4 g/L,氯化钠 0.2 g/L,pH 值 7.0~7.2。

二级摇瓶培养基:淀粉 10.0 g/L,蔗糖 4.0 g/L,硫酸铵 2.0 g/L,磷酸氢二钾 4.0 g/L,硫酸镁 4.0 g/L,三氯化铁 0.4 g/L,碳酸钙 1.0 g/L,酵母汁 0.4 g/L,pH 值 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 吸水倍率(Q)的测定方法 在大烧杯中称入重为 m_1 的干燥高吸水树脂,加入足量被测溶液搅拌,静置数小时后,160 目尼龙沙袋过滤,待液体自然滴干后,称得被液体溶胀后的吸水树脂重为 m_2 ,则高吸水树脂的吸水倍率用以下公式计算:

$$Q = (m_2 - m_1) / m_1 \text{ (H}_2\text{O/干树脂, g/g)}。$$

1.2.2 胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株发酵液的制备 250 mL 三角瓶装入 50 mL 一级摇瓶培养基,121 ℃ 灭菌 30 min,冷却后接种胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株斜面菌种,接种量为 2 接种环,30 ℃ 下 220 r/min 培养 12 h,达到对数期作为种子;接种到 8 个装有 80 mL 二级摇瓶培养基的 500 mL 三角瓶,接种量为 5 mL/瓶,30 ℃ 下 220 r/min 培养 40 h 左右,涂片镜检,待芽孢形成率达到 90% 以上时,停止培养,收集发酵液。

1.2.3 高吸水树脂对胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株的影响

1.2.3.1 高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株液态发酵的影响 配制二级摇瓶培养基 1 000 mL,分装于 12 个 500 mL 三角瓶中,6 个三角瓶中每瓶加入 0.5 g 高吸水树脂,另外 6 个三角瓶不加高吸水树脂,121 ℃ 灭菌 30 min;冷却后,分别接种 5 mL 上述处于对数期的胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株一级摇瓶培养液,30 ℃ 下 200 r/min 培养;接种后于 7.5、23.5、47.5 h 取样,观察高吸水树脂对胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株生长及芽孢形成的影响。

1.2.3.2 高吸水树脂(SAP)对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株平板生长的影响 采用稀释平板法^[11]分别在检测培养基和含高吸水树脂(SAP)的检测培养基上,计数胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株发酵液含菌量,确定高吸水树脂在平板上对胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株萌发的影响。

1.2.4 保水生物肥料的研制及技术参数的测定

1.2.4.1 保水生物肥料的研制 将草炭和胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株发酵液按照质量比 3:1 比例混合均匀,添加 20% 黏结剂,通过摇摆造粒机制成颗粒,粒径 2~4 mm,50 ℃ 恒温干燥 4 h;将该颗粒和高吸水树脂颗粒按照 9:1 的比例混合均匀,研制出保水生物肥料。

1.2.4.2 保水生物肥料技术指标的测定 采用稀释平板法进行保水生物肥料含菌量、杂菌含量等测定,依据 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》对保水生物肥料进行相关理化指标的测定,其中吸水倍率依据“1.2.1”的方法测定。

1.2.4.3 保水生物肥料的保存试验 将保水生物肥料放在试剂瓶中进行常温保存,在 15、30、60、120、180、240、300、360 d 时,依据 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》活菌平板计数方法进行含菌量和吸水倍率的测定^[11],并计算芽孢存活率:

芽孢存活率 = (保存结束芽孢含量/开始保存芽孢含量) × 100%。

2 结果与分析

2.1 高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株液态发酵的影响

胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株一级摇瓶 33 ℃ 培养 12 h,含菌量为 2.15×10^8 CFU/mL,转接在含高吸水树脂和不含高吸水树脂的摇瓶中培养,不同时间取样镜检,结果见表 1。

表 1 胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株在含 SAP 和不含 SAP 培养液中液态发酵情况

| 处理 | 培养时间(h) | 菌体形态 | pH 值 | 平均含菌量(CFU/mL) |
|--------|---------|------------|------|-------------------|
| 含 SAP | 7.5 | 个别长菌体 | 6.0 | 3.5×10^8 |
| 含 SAP | 23.5 | 菌体增多 | 6.5 | |
| 含 SAP | 47.5 | 菌体量少,未形成芽孢 | 6.5 | |
| 不含 SAP | 7.5 | 分裂旺盛 | 7.0 | 9.5×10^8 |
| 不含 SAP | 23.5 | 凝聚期 | 6.5 | |
| 不含 SAP | 47.5 | 全部形成芽孢并脱离 | 6.5 | |

在含 SAP 的培养液中,胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株生长缓慢,菌体弱小,变形,47.5 h 后未形成芽孢,含菌量仅为 3.5×10^8 CFU/mL;而胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株在不含 SAP 的培养液中发酵正常,培养 47.5 h 后,菌体全部形成芽孢,含菌量达到 9.5×10^8 CFU/mL。

可能是由于培养液中含有 SAP,黏度较大,影响了培养液的溶氧,抑制了菌体的生长,也可能是胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株受到高吸水树脂中某些有机物质的抑制,因而生长速率慢。

2.2 高吸水树脂(SAP)对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株平板生长的影响

将胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的摇瓶培养液进行系列稀释,并涂布在含有 SAP 和不含有 SAP 的平板上 33 ℃ 培养 48 h,结果见表 2。

表 2 胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株在含 SAP 和不含 SAP 平板的生长

| 处理 | 培养时间(h) | 含菌量(CFU/mL) |
|-----------|---------|-------------------|
| 含 SAP 平板 | 48 | 1.6×10^8 |
| 不含 SAP 平板 | 48 | 9.5×10^8 |

由表 2 可见,在含 SAP 平板和不含 SAP 平板上分别计数胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株培养液的含菌量,二者差距较大,在不含 SAP 平板上计数为 9.5×10^8 CFU/mL,在含 SAP 平板上计数为 1.6×10^8 CFU/mL。此外 SAP 还影响胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株菌落的大小,HX-02 菌株在含 SAP 平板上培养 48 h 后,菌落直径 2.1 mm,在不含 SAP 平板上菌落直径大约为 6.6 mm,证明高吸水树脂可以抑制胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的萌发和生长。

2.3 保水生物肥料的技术指标

对研制出的保水生物肥料进行技术指标和理化指标的测

定,结果见表 3 和表 4。本试验测得的技术指标基本高于国家标准规定的技术指标,因而保水生物肥料研制方法可行。

表 3 保水生物肥料技术参数的检验结果

| 检验项目 | 指标单位 | 测定结果 | GB 20287—2006 指标 |
|------------|----------------------|------|------------------|
| 胶冻样类芽孢杆菌含量 | $\times 10^8$ CFU/mL | 2.57 | ≥ 1.0 |
| 杂菌率 | % | 12.5 | ≤ 30 |
| 水分 | % | 8.2 | ≤ 20 |
| pH 值 | | 6.7 | 5.5~8.5 |
| 细度 | mm | 2~4 | 2~4 |

表 4 保水生物肥料理化指标及无害化指标的测定

| 检验项目 | 指标单位 | 测定结果 | GB 20287—2006 指标 |
|-----------|-------|--------|------------------|
| 吸水倍率 | | 25.6 | |
| 粪大肠菌群数 | 个/g | 0 | 100 |
| 蛔虫卵死亡率 | % | 100 | 100 |
| 砷(以 As 计) | mg/kg | 2.2 | ≤ 75 |
| 铅(以 Pb 计) | mg/kg | <0.05 | ≤ 100 |
| 镉(以 Cd 计) | mg/kg | <0.005 | ≤ 10 |
| 汞(以 Hg 计) | mg/kg | <0.03 | ≤ 5 |
| 铬(以 Cr 计) | mg/kg | <1.0 | ≤ 150 |

2.4 保水微生物肥料的保存试验

保水微生物肥料室温保存 15、30、60、120、240、300、360 d,测定含菌量和吸水倍率,结果见表 5,芽孢存活率和吸水倍率变化曲线见图 1。

表 5 保水生物肥料的保存试验

| 保存时间(d) | 含菌量(CFU/g) | 吸水倍率 |
|---------|--------------------|------|
| 15 | 2.57×10^8 | 25.6 |
| 30 | 2.40×10^8 | 25.2 |
| 60 | 2.37×10^8 | 25.4 |
| 120 | 2.30×10^8 | 25.1 |
| 240 | 2.27×10^8 | 25.7 |
| 300 | 2.20×10^8 | 25.0 |
| 360 | 2.23×10^8 | 25.5 |

由表 5 可以看出,将胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株颗粒与树脂颗粒混合在一起,进行 360 d 保存试验,含菌量从初始的 2.57×10^8 CFU/g 降低到最后的 2.23×10^8 CFU/g,降低幅度为 0.34×10^8 CFU/g,降低了 13.2%;而吸水倍率基本保持在 25.6 左右,变化不大。

从图 1 可知,芽孢存活率在 30 d 之内降低较快,到 120 d 时,降低到 89.5%,继续延长保存时间,变化已不大,保存到 360 d 时芽孢存活率仍为 86.8%。

本试验证实,尽管高吸水树脂无论在平板还是在液体培养条件下均抑制胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的生长,但将胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株与草炭制成颗粒后,高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株的抑制作用大大降低,确保了所研制的保水微生物肥料的商品化。

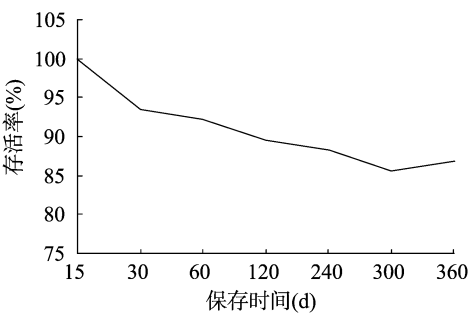


图 1 保水生物肥料芽孢存活率随保存时间的变化

3 结论

无论在液体培养还是在固体平板培养,高吸水树脂均影响胶质芽孢杆菌 HX-02 菌株的生长和芽孢的萌发。胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株在不含 SAP 摇瓶上培养 47.5 h,全部形成芽孢,含菌量达到 9.5×10^8 CFU/mL,在含 SAP 摇瓶上培养同样时间,仅少量形成芽孢;在不含 SAP 平板上菌落直径为 6.6 mm,在含 SAP 平板上菌落直径仅为 2.1 mm,且萌发率低。说明高吸水树脂对胶冻样类芽孢杆菌具有抑制作用。

通过将胶冻样类芽孢杆菌 HX-02 菌株与草炭制成颗粒,再与高吸水树脂按一定比例进行混合制成保水生物肥料,其理化指标、无害化指标和技术指标均符合 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》所规定的技术指标。说明采用这种方法可将高吸水树脂与微生物肥料有机结合,且方法可行。此外,保水微生物肥料的保存试验时间有待延长,且需要进行该产品的田间应用试验。

参考文献:

[1] 邹新禧. 超强吸水剂[M]. 北京:化学工业出版社,1991.

[2] Kim Y J, Yoon K J, Ko S W. Preparation and properties of alginate superabsorbent filament fibers crosslinked with glutaraldehyde[J]. J Appli Polym Sci, 2000, 78(10): 1797-1804.

[3] Raju M P, Raju K M. Design and synthesis of superabsorbent polymers[J]. J Appli Polym Sci, 2001, 80(14): 2635-2639.

[4] 王志玉, 刘作新. 高吸水树脂的性能及其在农业上的应用[J]. 土壤通报, 2004, 35(3): 352-356.

[5] 许建生. 超强吸水剂在现代农业中应用情况进展[J]. 农业与技术, 2008, 28(4): 19-20.

[6] 曹向红. 硅酸盐菌肥(生物钾肥)在我市农业生产中的试验和应用[J]. 现代农业科技:下半月刊, 2006(4): 83-84.

[7] 李元芳. 硅酸盐细菌肥料的特性和作用[J]. 土壤肥料, 1994(2): 48-49.

[8] 张爱民, 章淑艳, 张双凤. 具有杀虫效果的生物肥料的研制[J]. 河北大学学报:自然科学版, 2006, 26(4): 415-419.

[9] 蒋先军, 黄昭贤, 谢德体, 等. 硅酸盐细菌代谢产物对植物生长的促进作用[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 116-119.

[10] 乌兰. 高吸水性树脂在农业上的应用与前景展望[J]. 中国水土保持, 2006(4): 45-47.

[11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京:高等教育出版社, 1999.