

吴晓卫,付瑞敏,郭彦钊,等.耐盐碱微生物复合菌剂的选育、复配及其对盐碱地的改良效果[J].江苏农业科学,2015,43(6):346-349.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.113

耐盐碱微生物复合菌剂的选育、复配及其对盐碱地的改良效果

吴晓卫¹,付瑞敏^{1,2},郭彦钊¹,谷亚楠¹,薛婷婷¹,王雅雅¹,陈五岭¹

(1. 西北大学应用微生物学重点实验室,陕西西安 710069; 2. 河南教育学院人口与生命科学系,河南郑州 450046)

摘要:筛选得到 4 株能够在盐碱环境下生长的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、酵母菌(*Yeast*),并对这 4 株菌进行 He-Ne 激光诱变育种,正突变菌株能在高盐和高碱条件下生长。经过复配后将其作为功能菌发酵生产生物有机肥,应用于盐碱地改良。与对照相比,微生物复合菌剂对降低盐碱地含盐量、pH 值效果显著,有机质含量上升明显。在经过改良的盐碱土中种植紫花苜蓿,出苗率、株高、产量均不同程度增加。

关键词:诱变育种;生物有机肥;盐碱地;复合菌剂;紫花苜蓿

中图分类号: S156.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0346-04

陕西省是我国盐碱土分布面积最大的省份之一,盐碱地面积有 2.47 万 hm^2 ,占该省未利用土地面积的 2.14%^[1]。陕西省西安、宝鸡、咸阳、渭南、延安、榆林等 6 个地(市)均有盐碱土分布。位于关中平原东部的渭北卤泊滩地区,总盐碱土地总面积约 8 100 hm^2 ,涉及 7 个乡镇 53 个村,年降水量约 500 mm^[2],该滩由明代芦阳湖干涸后形成,位于渭河三级阶地,为一槽型封闭构造洼地,地势呈南北高、中间低走向。由于中间低、四周高,入水无去路,长期积于中部低洼区,造成卤泊滩地下水位较高,含盐量高。同时蒸发量较大,盐分随水从土壤毛管上移,形成严重的盐碱化^[3-4]。卤泊滩内土壤盐碱化使作物不能生长,影响当地农业经济的可持续发展。针对土壤盐碱化难题,当地政府在 1974 年组织群众修建排水治碱工程,以期治理盐碱化土壤。近年来,有关卤泊滩盐碱地改良技术也见诸报道,韩霁昌等在 1999 年以“改排为蓄、水地共处、和谐生态”的模式综合治理卤泊滩盐碱地^[2]。李清顺等在 2009 年用耐盐碱树种造林法辅以土地改良措施对卤泊滩盐碱地进行治理^[5]。当前所用的治理方法无法持续改良卤泊滩盐碱地,且收效甚微。本研究采用微生物处理的方法,筛选出耐盐碱的 4 株微生物,并对其进行诱变育种,将选育后的正突变株进行复配并作为功能菌发酵生产生物有机肥,用于盐碱地土壤改良,在改良后土壤中种植紫花苜蓿,分析改良前后土壤变化和紫花苜蓿生长发育情况,旨在明确该复合菌剂改良盐碱地的效果。

1 材料与方法

1.1 供试土样

试验土壤采集于陕西省渭南地区大荔县范家镇营南村,以潮土、盐土为主。土壤盐分含量多在 1% 以上,化学类型以氯化物为主,少部分化学类型为硫酸盐、硅酸盐。土壤有机质含量较低,土壤黏性高。耕层土壤含盐量 0.6%~1.6%,妨碍农作物生长。供试土壤 pH 值为 8.86,有机质含量 11.12 g/kg,全氮含量 0.61 g/kg,碱解氮含量 44.21 mg/kg,有效磷含量 7.57 mg/kg,速效钾含量 114.71 mg/kg,表层土壤盐含量 48.78 g/kg,地下 10 cm 土壤盐含量 17.46 g/kg,地下 30 cm 土壤盐含量 12.35 g/kg,地下 50 cm 土壤盐含量 9.38 g/kg,混合土壤盐含量 14.57 g/kg。

1.2 菌株

1.2.1 菌株分离 菌株是从西安市食盐厂附近所采集土壤样品中分离得到。

1.2.2 培养基 富集培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 15~20 g,水 1 L,pH 值 7.0~7.2。

初筛培养基(M63 培养基): KH_2PO_4 13.6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,葡萄糖 10 g, NaCl 20 g,去离子水 1 L,pH 值 7.5(用 KOH 调节)。

复筛培养基(M63 培养基): KH_2PO_4 13.6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,葡萄糖 10 g, NaCl 视需要添加,去离子水 1 L,pH 值 9(用 KOH 调节)。

以上培养基均在 0.1 MPa 下灭菌 20 min。

1.3 方法

1.3.1 微生物菌株分离 取土壤样品 10 g 置于 90 mL 无菌水中,充分混匀,150 r/min 振荡 30 min,得到 10^{-2} 土样稀释液,再依次稀释到 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ,吸取 0.1 mL 稀释液均匀涂布在富集平板上,30 °C 倒置培养 1 d^[6]。

1.3.2 耐盐菌初筛 选取富集培养基上生长快、菌落大的菌株接种于初筛平板上,30 °C 恒温培养 7 d,每个操作重复 3

收稿日期:2015-02-12

基金项目:陕西省“13115”科技创新工程计划(编号:2010ZDKG-70);陕西省科技统筹创新工程计划(编号:2011KTCG02-02);河南教育学院青年科研课题(编号:20100103)。

作者简介:吴晓卫(1988—),男,江西上饶人,硕士研究生,从事环境微生物研究。E-mail:wuxiaowei163163@163.com。

通信作者:陈五岭(1954—),教授,主要从事应用微生物技术研究。E-mail:wuling.chen@263.net。

次。将所得单菌落置于斜面保藏。

1.3.3 菌株形态与生理生化鉴定 用显微镜观察菌体形态和大小,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8]等文献中的方法进行生理生化鉴定。

1.3.4 诱变育种

1.3.4.1 菌悬液制备 将培养 7 d 的斜面用无菌水冲洗,冲洗液盛放在已灭菌、含有玻璃珠的三角瓶中,在往复式摇床上 150 r/min、35 ℃ 充分振荡培养 30 min,使菌株充分分散,诱变处理前将菌悬液稀释至 10⁶ 个/mL^[9]。

1.3.4.2 He-Ne 激光诱变 用灭菌的移液管吸取菌悬液 2 mL,装入无菌试管(直径 1 cm,壁厚 0.1 cm)中,使用 He-Ne 激光器(波长 632.8 nm,光斑直径 1.5 mm)照射,照射距离为 25 cm,输出功率为 15 mW,照射时间分别设置为 5、10、15、20、25、30 min,将原菌悬液作为空白对照,每个处理重复 3 次^[10-11]。

1.3.4.3 突变菌培养及性能检测 用灭菌的移液管吸取照射后的各处理菌悬液 1 mL,移入盛有无菌水的试管中,充分振荡混匀后,进行梯度稀释,并涂布于初筛平板,观察菌落形态及菌落生长,将原菌悬液作为空白对照,每个处理重复 3 次。统计初筛培养基上的平均菌落数,计算致死率^[12]。诱变后能够生长且菌落形态较大者为正突变株,反之则为负突变株。

正变率 = 正突变株落数/诱变前菌株数 × 100% ;

CFU = 同一稀释度的平均菌落数 × 稀释倍数/0.2;

致死率 = (对照 CFU - 处理 CFU)/对照 CFU × 100% 。

1.3.5 菌株复筛 将挑选出来的突变株进行培养后,划线转接到复筛培养基上培养,复筛培养基含盐量分别为 25、30、45、60、75、90、105、120 g/L,观察菌落生长情况,筛选高效耐盐碱菌株。

1.3.6 菌株复配及发酵生产生物有机肥 对复筛所得菌株进行拮抗性试验和菌株复配,制成复合微生物菌剂,将其按 0.3% 接种量接种于牛粪中,发酵生产生物有机肥,所产肥料按照 NY 884—2004《生物有机肥》的方法进行检测^[13]。

1.3.7 田间试验 田间试验于 2013 年 5—9 月进行,共设 4 个处理:CK(不施肥)、处理 1(施用 5 t/hm² 有机肥)、处理 2(施用 10 t/hm² 有机肥)、处理 3(施用 15 t/hm² 有机肥),每个处理面积 50 m²,随机区组排列。施用有机肥 15 d 后,在改造田上种植紫花苜蓿,种植期间各处理的整地、浇水、除草、播种期、种植密度等各项管理措施均一致。每个处理重复 3 次。

1.3.8 盐碱地土质改良指标检测^[14] 采用 EA-940 酸度计直接测量土壤 pH 值,采用浸出液烘干法测定土壤有机质含量,采用重铬酸钾容量法测定土壤有机质含量,采用米尺测量紫花苜蓿株高。按照以下公式计算出苗率:紫花苜蓿出苗率 = 出苗数/播种数 × 100% 。

1.3.9 数据分析 试验数据采用 Excel 2007、SPSS 20.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

经富集和初筛,从土壤中得到 12 株耐盐菌,初筛平板上

的菌落结果见表 1。在初筛培养基上生长较好的菌株分别为 NY5、NY16、NY35、NY41。所筛选出的菌株可以耐受 pH 值 7.5、耐盐 10 g/L。

表 1 初筛平板上的菌落结果

菌株	生长情况	菌株	生长情况	菌株	生长情况
NY1	+	NY3	+	NY35	++
NY5	++	NY9	+	NY41	++
NY13	+	NY16	++	NY46	+
NY24	+	NY34	+	NY51	+

注:“+”表示有菌落生长;“++”表示菌落个体大、数量多。

2.2 形态与生理生化鉴定

对初筛所选的 4 株菌进行形态与生理生化鉴定。形态学鉴定结果发现,菌株 NY5 细胞为杆状,直径大于 1.8 μm,有芽孢生成,革兰氏染色呈阳性;菌株 NY16 细胞为杆状,直径小于 1 μm,有芽孢生成,革兰氏染色呈阳性;菌株 NY35 细胞为杆状,直径 2.3 μm,不产芽孢,革兰氏染色呈阴性反应;菌株 NY41 细胞为椭圆形,直径大于 3 μm,不产芽孢,革兰氏染色呈阳性。生理生化鉴定结果见表 2。

表 2 生理生化鉴定结果

反应项目	NY5	NY16	NY35	NY41
葡萄糖产酸	+	+	+	+
甲基红反应	+	+	-	+
V.P 反应	+	+	-	+
过氧化氢酶反应	+	+	+	+
氧化酶反应	-	-	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	-	-
明胶水解	-	+	+	-
硝酸盐还原	-	+	+	-
L-酪氨酸	+	+	-	-
11% NaCl 培养	+	+	+	+
50 ℃ 生长	+	+	+	+

注:“+”“-”分别表示在生理生化鉴定中呈阳性、阴性反应。

对照《常见细菌系统鉴定手册》《伯杰氏细菌鉴定手册》,可将这 4 株菌分别鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)(NY5)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)(NY16)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)(NY35)、酵母菌(*Yeast*)(NY41)。

2.3 He-Ne 激光诱变结果

图 1、图 2、图 3、图 4 分别为菌株 NY16、NY5、NY35、NY41 经过诱变后的突变结果。对比致死率与正突变率,确定菌株最佳诱变时间为 15 min。

2.4 菌株复筛结果

挑选菌株形态大、菌落数量多的突变株进行复筛。由表 3 可以看出,经过激光诱变后,菌株耐盐碱性明显增强。其中枯草芽孢杆菌 NY16 突变株 NY16-HN 耐盐性达到 120 g/L,巨大芽孢杆菌 NY5 突变株 NY5-HN 耐盐性达到 105 g/L,假单胞菌 NY35 突变株 NY35-HN 耐盐性达到 90 g/L,酵母菌 NY41 突变株 NY41-HN 耐盐性达到 75 g/L,比初筛菌耐盐性增加,说明这 4 株菌基本达到诱变目的。

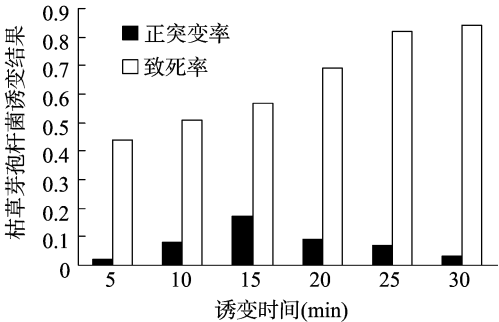


图1 枯草芽孢杆菌 NY16 诱变结果

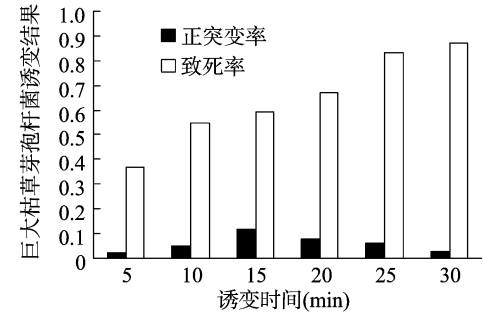


图2 巨大芽孢杆菌菌株 NY5 诱变结果

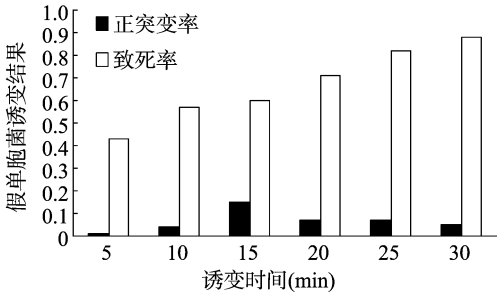


图3 假单胞菌 NY35 诱变结果

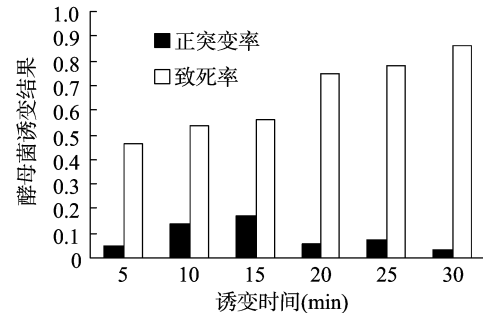


图4 酵母菌 NY41 诱变结果

2.5 复合微生物菌肥复配结果

对菌株进行“两两”组合,开展拮抗性试验,结果显示这 4 株菌间没有拮抗性。将 4 种菌株按照不同比例进行复配,检测发酵时菌肥的最高温度及最高温度保持时间,确定最佳配比^[15]。4 种菌株复配方案:方案 1:菌株 NY5 - HN、NY16 - HN、NY3 - HN、NY41 - HN 的比例为 1 : 1 : 1 : 1;方案 2:菌株 NY5 - HN、NY16 - HN、NY3 - HN、NY41 - HN 的比例为

表 3 复筛结果

含盐量 (g/L)	复筛结果			
	NY5 - HN	NY35 - HN	NY16 - HN	NY41 - HN
25	+	+	+	+
30	+	+	+	+
45	+	+	+	+
60	+	+	+	+
75	+	+	+	+
90	+	+	+	-
105	+	-	+	-
120	-	-	+	-

注:“+”表示有菌落生长;“-”表示无菌落生成。

2 : 1 : 1 : 1;方案 3:菌株 NY5 - HN、NY16 - HN、NY3 - HN、NY41 - HN 的比例为 2 : 2 : 1 : 1;方案 4:菌株 NY5 - HN、NY16 - HN、NY3 - HN、NY41 - HN 的比例为 1 : 2 : 1 : 1。

如图 5 所示,菌株 NY5 - HN、NY16 - HN、NY3 - HN、NY41 - HN 的最佳配比为 2 : 2 : 1 : 1,从发酵复配菌剂中分离得到菌株 4 株,经过比对鉴定,复配后菌株未发生变异。发酵后的 4 种菌株按该比例复配制成微生物复合菌剂,用于发酵生产改良盐碱地的生物有机肥。

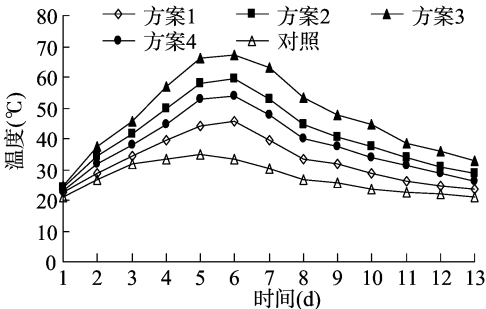


图5 复配菌剂发酵菌肥温度变化

2.6 大田试验结果

2.6.1 不同施肥量对盐碱土 pH 值、含盐量、有机质含量的影响 将生物有机肥施于盐碱地中,处理时间为 150 d,每隔 30 d 测定各处理的 pH 值、全盐含量、有机质含量变化情况。从表 4 可以看出,随着施肥时间和施肥量的增加,各施肥处理的盐碱土 pH 值、含盐量、有机质含量均有不同程度的变化,主要表现为随着施肥时间和施肥量的增加,盐碱土 pH 值、含盐量均下降,其下降程度与施肥量呈正比;而土壤有机质含量随施肥时间延长有所上升,其上升程度与施肥量呈正比^[16-17]。对照组的 pH 值、全盐含量以及有机质含量均无太大变化。综上,施用生物有机肥对降低盐碱土 pH 值、含盐量和增加土壤有机质含量有较好效果。

2.6.2 不同施肥处理对作物生长的影响 将生物有机肥施于盐碱地 15 d 后,在各处理的地里分别栽种紫花苜蓿,于栽种 15 d 后测其出苗率,于栽种 120 d 后测其株高、计算产量。由表 5 可以看出,随着施肥量增加,紫花苜蓿的出苗率、株高、产量均有不同程度的增加,其增加量和施肥量呈正比^[18],其中处理 1、处理 2 的紫花苜蓿出苗率、株高、产量较对照有较大增幅,而处理 3 较处理 2 增幅不明显,综合考虑成本等因素,应以处理 2 为标准进行大规模应用。

表 4 不同施肥处理对盐碱土 pH 值、含盐量、有机质含量的影响

性状	处理	5 月 20 日	6 月 19 日	7 月 19 日	8 月 18 日	9 月 17 日
pH 值	CK	8.83 ± 0.16d	8.77 ± 0.13d	8.71 ± 0.06d	8.62 ± 0.14d	8.55 ± 0.08d
	处理 1	8.55 ± 0.22c	8.36 ± 0.07c	8.18 ± 0.08c	7.99 ± 0.04c	7.84 ± 0.11c
	处理 2	8.43 ± 0.11b	8.17 ± 0.14b	7.89 ± 0.15b	7.57 ± 0.07b	7.42 ± 0.03b
	处理 3	8.34 ± 0.05a	7.98 ± 0.80a	7.78 ± 0.06a	7.44 ± 0.03a	7.31 ± 0.07a
全盐含量(g/kg)	CK	14.45 ± 0.03b	14.23 ± 0.11b	14.08 ± 0.04c	13.94 ± 0.08c	13.82 ± 0.07c
	处理 1	12.58 ± 0.04a	11.14 ± 0.03a	10.31 ± 0.06b	8.62 ± 0.02b	7.33 ± 0.07b
	处理 2	11.74 ± 0.01a	10.36 ± 0.04a	8.13 ± 0.02a	6.77 ± 0.03a	5.48 ± 0.03a
	处理 3	10.51 ± 0.02a	9.48 ± 0.05a	7.74 ± 0.07a	5.83 ± 0.04a	4.46 ± 0.10a
有机质含量(g/kg)	CK	11.25 ± 0.12b	11.23 ± 0.19b	11.14 ± 0.16b	11.19 ± 0.20b	11.12 ± 0.22b
	处理 1	12.48 ± 0.14ab	13.63 ± 0.18ab	15.46 ± 0.18ab	15.84 ± 0.23ab	15.87 ± 0.24ab
	处理 2	13.51 ± 0.11a	15.87 ± 0.20a	17.89 ± 0.15a	18.63 ± 0.19a	18.88 ± 0.21a
	处理 3	14.88 ± 0.13a	18.12 ± 0.21a	19.54 ± 0.19a	20.56 ± 0.21a	20.57 ± 0.22a

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

表 5 不同施肥处理对紫花苜蓿出苗率、成熟株高、产量的影响

处理	出苗率 (%)	株高 (cm)	产量 (kg/hm ²)
CK	64.2 ± 1.22	54.6 ± 2.52c	5 577.4 ± 132.2
处理 1	79.6 ± 1.56	67.2 ± 1.88b	7 843.7 ± 119.6
处理 2	83.4 ± 1.03	72.6 ± 1.24a	8 932.5 ± 147.4
处理 3	84.5 ± 1.62	73.3 ± 1.18a	9 031.6 ± 103.8

3 结论与讨论

由于陕西省渭北卤泊滩地区盐碱地地下水位较高、含盐量高,同时蒸发量较大、降水量小,盐碱地改善治理面临严峻形势。因为盐碱地土壤盐分的大量积累,导致土壤黏性增加、透气性差,土壤孔隙度和容重变化,土壤温度降低,土壤中有益微生物生长缓慢,造成土壤冷、硬、板结现象,最终导致盐碱土养分低,肥力不足,影响农业经济可持续发展^[19]。

本研究从食盐厂附近的土壤中筛选分离得到 4 株耐盐菌株 NY16、NY5、NY35、NY41,经过形态学生理生化鉴定,这 4 株菌分别为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、酵母菌。为进一步提高其耐盐性,对这 4 种菌分别进行 He-Ne 激光诱变,然后选育正突变株,用高盐碱培养基进行复筛,将复筛得到的菌株按不同比例进行复配,检测其发酵结果,得到菌株 NY16、NY5、NY35、NY41 的最佳配比为 2:2:1:1,将菌株按该比例复配后用于发酵生产生物有机肥。将所产菌肥以不同添加量作用于盐碱地中,定期检测、记录土壤 pH 值、全盐含量、有机质含量变化,并于施肥 15 d 后种植紫花苜蓿,在种植紫花苜蓿后的 120 d 内,测其出苗率、成熟株高、总产量,结果显示本研究制备的复合菌剂发酵生产的生物有机肥既可有效降低盐碱地的 pH 值、含盐量,又能极大程度地改善土壤有机质含量,具有很好的社会效益,可进行大规模应用。

参考文献:

[1]李国胜,马超群. 从土地利用变化看陕西省生态环境的转变[J]. 干旱区地理,2005,28(5):647-653.
[2]韩弄昌,解建仓,朱记伟,等. 陕西卤泊滩盐碱地综合治理的和谐生态模式研究与实践[M]. 西安:陕西科学技术出版社,2009.

[3]赵明清,徐森,王东梅. 吉林省西部盐碱地土壤类型及利用建议[J]. 现代农业科技,2011(21):299-301.
[4]姜仁贵,解建仓,马斌,等. 卤泊滩盐碱地综合治理和谐生态模式成效分析[J]. 水资源与水工程学报,2009,20(3):111-113,118.
[5]李清顺,卢志伟. 渭南市卤泊滩盐碱地造林方法探讨[J]. 林业调查规划,2009,34(4):123-125.
[6]左雪枝,方方舟. 牛粪堆肥中高效菌株的筛选与应用效果[J]. 中国土壤与肥料,2014(1):95-100.
[7]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
[8]Hot G J,Krieg R N,Sneath H P,et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Baltimore:Williams & Wilkins Company,1994.
[9]付瑞敏,韩鸿鹏,张丽琴,等. 葡萄霜霉病和白粉病拮抗菌的分离、鉴定和 He-Ne 激光诱变[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):122-125.
[10]郭爱莲,朱宏莉. 紫外、氦氮激光等复合诱变产果胶酶细菌 ZH1 的研究[J]. 光子学报,2002,31(11):1335-1339.
[11]胡青平. 番茄早疫病广谱拮抗微生物的选育及拮抗机理研究[D]. 西安:西北大学,2008.
[12]巩洁,陈亮,陈立,等. 紫外线、He-Ne 激光对葡萄白腐病菌拮抗菌 PT2 的复合诱变效应[J]. 植物保护,2010,36(5):105-109.
[13]中华人民共和国农业部种植业管理司. NY 884—2004 生物有机肥[S]. 北京:中国农业出版社,2000:16-106.
[14]鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:16-106.
[15]王琦. 牛粪发酵生产生物有机肥的工艺优化及应用研究[D]. 西安:西北大学,2008.
[16]于秀丽,赵明家. 增施生物有机肥对盐碱土壤养分的影响[J]. 吉林农业大学学报,2013,35(1):50-54,57.
[17]宇万太,姜子绍,马强,等. 施用有机肥对土壤肥力的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(5):1057-1064.
[18]郑普山,郝保平,冯悦晨,等. 不同盐碱地改良剂对土壤理化性质、紫花苜蓿生长及产量的影响[J]. 中国生态农业学报,2012,20(9):1216-1221.
[19]高亮,丁春明,王炳华,等. 生物有机肥在盐碱地上的应用效果及其对玉米的影响[J]. 山西农业科学,2011,39(1):47-50.