

曹 鹏,付学鹏,王绍娴,等. 土壤高压蒸汽灭菌的条件优化及其对植物生长的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):456-458.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.127

# 土壤高压蒸汽灭菌的条件优化及其对植物生长的影响

曹 鹏,付学鹏,王绍娴,吴凤芝

(东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 151030)

**摘要:**利用高压蒸汽对土壤灭菌是研究土壤微生物学的常用方法,用高压蒸汽灭菌方法(121 ℃,30 min)对土壤灭菌,调查灭菌次数对土壤灭菌效果、土壤化学性质变化、黄瓜幼苗生长的影响。结果表明,灭菌1次即可完全清除土壤里的真菌,但灭菌3次才可完全清除土壤里的细菌;灭菌土壤的pH值和EC值均显著高于未灭菌土壤,且随着灭菌次数的增加,pH值和EC值都呈现上升趋势;土壤灭菌显著降低黄瓜幼苗的株高和地上部鲜质量,并且随着灭菌次数的增加,黄瓜幼苗的株高和地上部鲜质量都呈现下降趋势;与灭菌2次的土壤相比,灭菌3次的土壤对黄瓜幼苗生长的抑制作用不显著,并且pH值和EC值的变化也不显著。因此,在土壤微生物学研究中需要根据需要选择灭菌次数。

**关键词:**高压蒸汽灭菌;灭菌次数;土壤微生物;植物生长

**中图分类号:** Q93-334;S642.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0456-03

土壤灭菌能够消除或降低土壤微生物活性,是土壤生物学研究中常用的试验方法。在研究土壤-微生物-植物之间的相互作用、土壤单一菌群、土壤酶、土壤有机质降解与吸附以及杀菌剂在土壤中的移动等方面都要求土壤的无菌环境<sup>[1-4]</sup>。比如作物连作会降低作物的产量和品质,造成严重的连作障碍。对土壤进行灭菌能够研究土壤微生物对作物连作障碍的“贡献”。季尚宁等对连作大豆的土壤进行灭菌处理后种植大豆,发现经过灭菌的大豆茬土壤栽培的株高、干质量和鲜质量均大大超过了未灭菌的豆茬土壤,缓解了连作障碍<sup>[5]</sup>;吴凤芝等对连作黄瓜的土壤灭菌后,种植黄瓜幼苗的株高、茎粗和根系活力都显著高于未灭菌土壤中的植株<sup>[6]</sup>。

目前常用的土壤灭菌方法有高温灭菌法、 $\gamma$ 射线灭菌法、化学熏蒸法、苯菌灵抑制法和物理割断法等5种常用方法。这5种方法各有利弊:高温灭菌法、 $\gamma$ 射线灭菌法和化学熏蒸法适用于室内试验,但它们对土壤理化性质有一定的影响;化学熏蒸法会污染环境;苯菌灵抑制法和物理割断法适用于室外试验,其中苯菌灵抑制法也会污染环境,须严格控制药剂用量;物理割断法虽然环保,但可能影响土壤中水分和营养成分的交换<sup>[2-3,7-9]</sup>。

在众多的土壤灭菌方法中,高压蒸汽灭菌是实验室普遍使用的方法,国内外大量研究报告中都采用高压蒸汽灭菌方法进行土壤灭菌<sup>[3,10-11]</sup>。高压蒸汽灭菌的效果受到灭菌的温度、灭菌时间、灭菌次数等条件的影响,并且高压蒸汽灭菌能够引起土壤理化性质的改变,进而影响植物的生长。Mahmood等用121℃高压蒸汽对土壤灭菌1 h,显著提高了土壤的电导率、水溶性碳和可溶性锰,提高了小麦根的生物量、根长、

表面积、体积及根尖数<sup>[3]</sup>。Verhagen等为研究根际细菌诱导的系统抗性,对土壤进行蒸汽灭菌2次,每次20 min<sup>[8]</sup>。李会娜等对土壤进行高压灭菌3次(121 ℃、30 min,连续3 d),发现菜园土灭菌后,紫茎泽兰的株高和生物量显著低于对照处理(未灭菌),而对于番茄的生长具有促进作用<sup>[12]</sup>。梁智等用高压蒸汽灭菌,在1个大气压下高温湿热灭菌2 h,使棉花株高降低12.7%,地上部干物质质量减少66.7%,地下部干物质质量减少44.5%<sup>[13]</sup>。由此可见,对于土壤的高压蒸汽灭菌的条件比较混乱,没有统一的标准,最重要的是没有验证不同灭菌条件下的灭菌效果。目前对于高压蒸汽灭菌的温度、时间、次数、灭菌效果及其对植物生长的影响尚未见报道。本试验在前人研究的基础上,研究灭菌次数对土壤真菌、细菌的清除效果,以及对黄瓜幼苗生长的影响,以期对利用高压蒸汽进行土壤灭菌的条件进行优化,为相关研究提供参考和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试品种 黄瓜品种为津研四号,购自天津科润黄瓜研究所。

1.1.2 供试土壤 土壤为采自东北农业大学园艺站的育苗土。

### 1.2 方法

1.2.1 土壤灭菌 试验共设4个处理:未灭菌(CK)、灭菌1次(CS<sub>1</sub>)、灭菌2次(CS<sub>2</sub>)、灭菌3次(CS<sub>3</sub>)。将2 kg土壤样品装入直径为25 cm、长度为40 cm的灭菌袋(高密度聚乙烯膜,北京鑫明宏塑料有限公司)中图1,于立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)中灭菌,每次灭菌的条件为121 ℃(0.1~0.2 MPa)高温灭菌30 min。每次灭菌间隔24 h。

1.2.2 灭菌土壤中细菌和真菌的培养和数量检测 参照Komad等的方法<sup>[14-15]</sup>,用平板培养法测定黄瓜根际土壤中细菌和真菌的数量。细菌测定采用牛肉膏蛋白胨培养基;真菌测定采用马丁氏培养基。

收稿日期:2015-07-26

基金项目:国家大宗蔬菜产业技术体系(编号:CARS-25-08)

作者简介:曹 鹏(1989—),男,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生,研究方向为设施园艺与蔬菜生理生态。E-mail: caopeng511@qq.com。

通信作者:吴凤芝,博士教授,博士生导师,研究方向为设施园艺与蔬菜生理生态。E-mail: fzwu2006@aliyun.com。



图1 土壤灭菌袋

本试验中所用的灭菌袋每袋装入 2 kg 土,是为了保证灭菌效果和高压灭菌器的容积,使其更有利于灭菌。将每个处理的土壤随机取出 3 袋,在超净工作台(DL-CJ-2ND,北京东联哈尔仪器制造有限公司)中取袋中间部分的土壤 5 g,加入到盛有 45 mL 无菌水的锥形瓶(250 mL)中,振荡 15 min 使土样中菌体、芽孢或孢子均匀分散,静置 1 min 后依次制成 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 梯度的土壤稀释液。

在超净工作台中,依次在分离细菌和真菌的培养基上用平板涂布法涂布 $10^{-5}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 的土壤稀释液 100  $\mu$ L,每个处理重复 3 次,每个重复涂布 5 个平板。置于 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中暗培养 3~7 d,观察计数并计算单位质量干土细菌和真菌的数量。

表 1 灭菌次数对土壤细菌和真菌数量的影响

不同处理	不同培养时间的微生物数量					
	细菌数量( $\times 10^6$ CFU/g)			真菌数量(万 CFU/g)		
	2d	3d	4d	2d	3d	4d
CK	6.09 $\pm$ 0.55a	15.97 $\pm$ 0.34a	27.87 $\pm$ 0.54a	—	1.94 $\pm$ 0.27	4.25 $\pm$ 0.57
CS1	3.43 $\pm$ 0.15b	6.42 $\pm$ 0.14b	13.0 $\pm$ 0.77b	—	—	—
CS2	1.38 $\pm$ 0.11c	3.09 $\pm$ 0.34c	5.51 $\pm$ 0.73c	—	—	—
CS3	—	—	—	—	—	—

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。“—”表示平板上没有菌落产生。

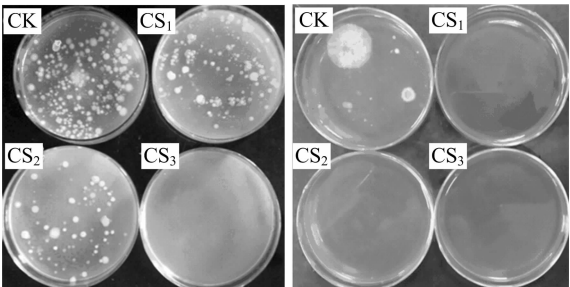


图2 培养 3 d 时不同处理细菌和真菌的数量情况

2.2 灭菌次数对土壤 pH 值和 EC 值的影响

由图 3 可以看出,未灭菌的土壤 pH 值显著低于灭菌土壤,但是灭菌不同次数的土壤其 pH 值变化不显著;土壤 EC 值随土壤灭菌次数的增加而升高,但是灭菌 2、3 次的 EC 值差异不显著。

2.3 灭菌次数对黄瓜幼苗生长的影响

黄瓜幼苗定植 40 d 的生长情况见图 4。本研究中未灭菌

1.2.3 灭菌次数对土壤 pH 值和 EC 值的影响 根据鲍士坦等的方法<sup>[16]</sup>,分别取不灭菌(CK)、灭菌 1 次(CS<sub>1</sub>)、灭菌 2 次(CS<sub>2</sub>)、灭菌 3 次(CS<sub>3</sub>)土壤各 5 g 溶于 25 mL 无菌蒸馏水(土水比 1:5)中,充分混匀后分别用 pH 计(S20,梅特勒-托利多仪器有限公司)和电导率仪(FE30,梅特勒-托利多仪器有限公司)测定 pH 值和 EC 值。

1.2.4 土壤灭菌次数对黄瓜幼苗生长的影响 2014 年 11 月 30 日播种育苗,子叶展平时定植于装有上述不同处理土壤的营养钵(8 cm $\times$ 8 cm)中,每钵 200 g 土、1 株黄瓜幼苗。每个处理 30 次重复,共 120 钵。于东北农业大学园艺站人工气候室培养,光照时间和湿度设置:光照时间 12 h/d(6:00—20:00),光照度为 7 000 lx;湿度为 75%。每 2 d 每钵定量浇 50 mL 无菌水。不使用杀菌剂和杀虫剂。为了消除光照造成的误差,定期调换幼苗的位置。

在定植 20 d(2 叶 1 心期)和 40 d(4 叶 1 心期)时取样,每个处理分别随机选 10 株黄瓜幼苗测定株高和地上部鲜质量。

2 结果与分析

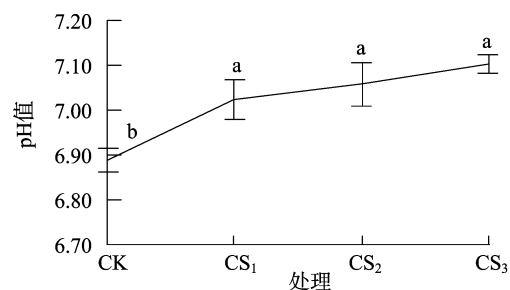
2.1 灭菌次数对土壤细菌和真菌数量的影响

高压蒸汽灭菌能有效杀死土壤中的微生物。由表 1、图 2 可见,与对照相比,灭菌 1 次(CS<sub>1</sub>)可以有效地杀灭土壤中的真菌,且培养 3、4 d 的平板都未见真菌菌落出现,说明灭菌 1 次即可杀灭土壤中的真菌;但是对于细菌,灭菌 2 次后还有大量的菌落出现,直到灭菌 3 次才未见菌落出现。

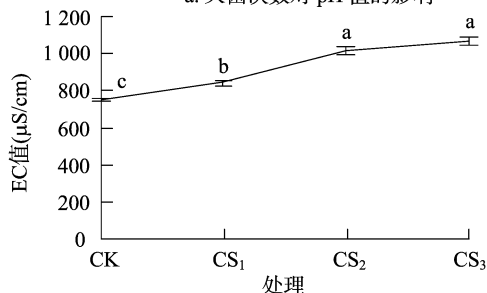
土壤种植的黄瓜幼苗在 20、40 d 时地上部鲜质量和株高均显著高于灭菌土壤;与对照相比,随着灭菌次数的增加,在 20 d 时,黄瓜幼苗的地上部鲜质量分别减少了 25%、49% 和 52%,株高分别降低了 13%、27% 和 29%,但 2 次灭菌和 3 次灭菌差异不显著;在 40 d 时,黄瓜地上部鲜质量分别减少了 25%、60% 和 63%,株高分别降低了 24%、37% 和 40%,但 2 次灭菌和 3 次灭菌差异不显著。

3 讨论与结论

高压蒸汽灭菌是在较高的温度和气压下进行的,势必会对土壤的理化性质产生影响,进而影响植物的生长。Mahmood 等用 121  $^{\circ}$ C 高压蒸汽对土壤灭菌 1 h,显著提高了土壤的电导率<sup>[3]</sup>,和本试验结果一致。李会娜等用高压蒸汽灭菌 3 次的菜园土培养紫茎泽兰,发现紫茎泽兰的株高和生物量显著低于对照处理(未灭菌)<sup>[12]</sup>。梁智等用高压蒸汽灭菌的土壤种植棉花,使棉花株高降低 12.7%,地上部干物质质量减少 66.7%,地下部干物质质量减少 44.5%<sup>[13]</sup>。



a. 灭菌次数对 pH 值的影响



b. 灭菌次数对 EC 值的影响

不同处理间标有不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。图5同

图3 灭菌次数对土壤 pH 值和 EC 值的影响

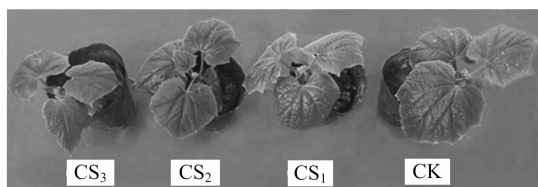
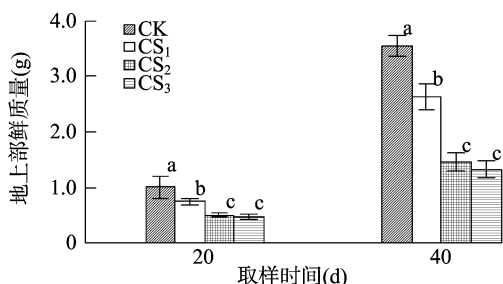
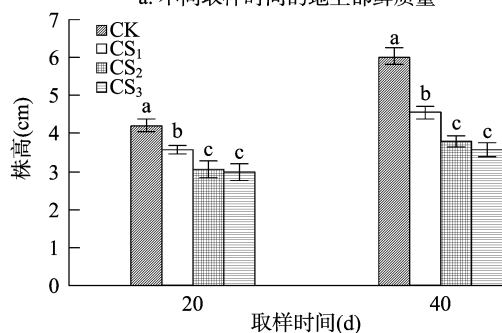


图4 黄瓜幼苗定植40 d 时的生长情况



a. 不同取样时间的地上部鲜质量



b. 不同取样时间的株高

图5 黄瓜幼苗生长20、40 d时地上部鲜质量和株高

0.2 MPa)条件下灭菌,每次灭菌 30 min,灭菌 1 次就能消除土壤中的真菌,而消除细菌则需要灭菌 3 次。灭菌次数越多必然使灭菌效果更好,但是不可避免地会对土壤的理化性质造成影响。与未灭菌的土壤相比,灭菌显著提高了土壤的 pH 值和 EC 值,但是灭菌 2 次和灭菌 3 次后这 2 个指标没有显著变化。同样,从对植物生长的反馈结果来看,几次灭菌的土壤均显著抑制了黄瓜幼苗的生长,但是灭菌 2 次和 3 次的土壤对黄瓜幼苗生长的影响则不显著。因此,如果想消除土壤中的真菌,只要灭菌 1 次即可;而要消除所有的微生物,则最好灭菌 3 次。

#### 参考文献:

- [1] Degrange V, Lensi R, Bardin R. Activity, size and structure of a *Nitrobacter* community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1997, 24(2): 173–180.
- [2] Luo Y M, Yan W D, Christie P. Soil solution dynamics of Cu and Zn in a Cu- and Zn- polluted soil as influenced by  $\gamma$ - irradiation and Cu- Zn interaction[J]. *Chemosphere*, 2001, 42(2): 179–184.
- [3] Mahmood T, Mehnaz S, Fleischmann F, et al. Soil sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings[J]. *Pedobiologia*, 2014, 57(3): 123–130.
- [4] Rroćo E, Kosegarten H, Harizaj F, et al. The importance of soil microbial activity for the supply of iron to sorghum and rape[J]. *European Journal of Agronomy*, 2003, 19(4): 487–493.
- [5] 季尚宁, 肖玉珍, 田慧梅, 等. 土壤灭菌对连作大豆生长发育的影响[J]. *东北农业大学学报*, 1996, 27(4): 326–329.
- [6] 吴凤芝, 王伟, 栾非时. 土壤灭菌对大棚连作黄瓜生长发育影响[J]. *北方园艺*, 1999(5): 49.
- [7] Shcherbakova T A, Nikitin D I, Volkovskaia N G. Use of gamma- irradiation of soil for analyzing the state of microbial coeneses[J]. *Mikrobiologiya*, 1974, 44(2): 325–329.
- [8] Verhagen B W, Glazebrook J, Zhu T, et al. The transcriptome of rhizobacteria- induced systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 2004, 17(8): 895–908.
- [9] 侯永侠, 周宝利, 吴晓玲, 等. 土壤灭菌对辣椒抗连作障碍效果[J]. *生态学杂志*, 2006, 25(3): 340–342.
- [10] 谢越, 杨高文, 周翰舒, 等. 丛枝菌根真菌研究中土壤灭菌方法综述[J]. *草业科学*, 2012, 29(5): 724–732.
- [11] Mcnamara N P, Black H, Beresford N A, et al. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2003, 24(2): 117–132.
- [12] 李会娜, 刘万学, 万方浩. 土壤灭菌对紫茎泽兰和番茄的反馈作用[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(16): 186–189.
- [13] 梁智, 周勃, 邹耀湘, 等. 土壤湿热灭菌对连作棉花生长发育的影响[J]. *西北农业学报*, 2007, 16(2): 87–89.
- [14] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil[J]. *Review of Plant Protection Research*, 1975, 8: 114–124.
- [15] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980.

在本试验中, 利用高压蒸汽灭菌器, 在 121 ℃ (0.1 ~