

孔德柱,张树峰,周玉生,等.固氮鱼腥藻在小麦和西红柿上的肥效[J].江苏农业科学,2016,44(10):499-502.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.143

固氮鱼腥藻在小麦和西红柿上的肥效

孔德柱¹,张树峰¹,周玉生¹,郝亚峰²

(1.亿利资源集团有限公司,北京 100031; 2.鄂尔多斯市亿利沙漠生物质能源有限责任公司,内蒙古鄂尔多斯 017400)

摘要:为了研究固氮鱼腥藻 *Anabaena Azotica* 119 作为未来生物肥料的可能性,分别以小麦和西红柿为目标作物,设计了藻肥、尿素和羊粪的肥效对比试验和藻肥改善土壤氮含量试验。结果显示:生长 50 d 的小麦,藻肥组鲜质量为 33.7 g,是对照组的 3 倍;干质量为 10.4 g,是对照组的 2 倍。生长 50 d 的西红柿,藻肥组的鲜质量为 87.7 g,是空白对照的 15 倍,是羊粪和尿素的 2 倍还多;藻肥组干质量为 11.4 g,是空白对照组的 14 倍。施用藻肥的土壤在 90 d 后,含氮量可以提高 416%,维持在 0.075% 左右。固氮鱼腥藻在土壤中能够持续固定空气中的氮气,有望开发成为环境友好、肥效持久的生物肥料。

关键词:固氮鱼腥藻;肥效;土壤氮含量;生物肥料

中图分类号: S142+.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0499-03

固氮蓝藻是一类低等原核植物,能固定空气中分子态氮成为氮素化合物^[1]。很早以前人们就发现了藻类对植物具有肥效作用^[2-3]。1939 年人们发现生长在稻田的固氮蓝藻可以使水稻连年保持较高的产量^[4]。John 研究了蓝藻作为肥料固氮的能力,并在开放池中进行了蓝藻培育^[5],但没有对后续的肥效做进一步研究。夏建明等研究了固氮蓝藻对稻田的肥效作用,无论是干藻还是鲜藻,施用于水稻后,水稻的鲜质量和干质量相比于对照都有明显的提高^[6]。Mohammed 等用豌豆对蓝藻肥料进行试验,发现蓝藻肥料配合化肥施用后豌豆的生长效果更好,甚至可以用蓝藻肥料代替一半的化肥^[7]。但到目前为止,对蓝藻肥料的研究并不系统,蓝藻作为肥料也多见于在水稻上的应用^[8-9],在其他作物的应用仍鲜有报道。本研究基于对现有尿素等氮肥生产能耗高、环境污染大^[10]、对土壤有害^[11]等弊端,研究了固氮蓝藻作为氮肥对小麦和西红柿的肥效及对土壤氮含量的改善,希望能在未来开发出一种环境友好、肥效持久的生物肥料。

1 材料与方法

1.1 藻种

固氮鱼腥藻 *Anabaena azotica* 119,由中国科学院武汉水生生物研究所提供,筛选分离自库布其地区土壤。

1.2 藻种培养基

采用 BG11 缺氮培养基。

1.3 培养条件

在恒温光照摇床中培养,光照:60 000~80 000 lx;光暗周期 12 h—12 h;温度:28 ℃;摇床转速:150 r/min。培养基 pH 值:7.0~7.5;选择 1 L 锥形瓶,每瓶装液量 0.5 L。

收稿日期:2015-11-10

基金项目:国家科技部国际合作项目(编号:2011DFA32640)。

作者简介:孔德柱(1984—),男,黑龙江绥化人,硕士,工程师,主要从事生物质应用领域项目开发。Tel:(010) 56632598;E-mail:kongdezhu.kong@163.com。

1.4 固氮鱼腥藻 119 显微镜观察

用滴管吸取培养 7 d 的固氮鱼腥藻 119 培养液,滴入事先准备好的载玻片上,轻轻盖上盖玻片,选择 10 倍目镜和 40 倍物镜观察。

1.5 固氮鱼腥藻 119 生长曲线测定

固氮鱼腥藻在培养过程中会分泌多糖而出现藻之间团聚和贴壁现象,所以 *D* 值和细胞计数法研究藻的生长状况并不适合。所以本研究采用如下方法测定其生长曲线:取 1 L 锥形瓶 15 个,洗净,烘干,称量,记录瓶质量。每瓶中加入 500 mL 培养基,接种量 10%,放入光照摇床中培养,每 2 d 取样,70 ℃烘箱中干燥至恒质量。

1.6 固氮鱼腥藻氮含量测定

委托中国科学院武汉水生生物研究所检测。

1.7 小麦和西红柿肥效试验

选择库布其当地沙土装于直径为 18 cm 的花盆中,分别以小麦和西红柿为目标作物,施肥量以 200 kg/hm² 纯氮^[12-13]为基准换算,每个花盆施用纯氮 0.5 g。尿素组:每个花盆施用尿素 1.1 g;羊粪组:羊粪含氮量为 2.3%^[14],每个花盆施用羊粪 21.7 g。藻肥组:需要累积施用干藻 7 g,用培养 22 d 成熟的固氮鱼腥藻 119 藻液,藻液含藻量 0.7 g/L,浓缩 5 倍,对植物进行浇灌,每次浇灌 1 L,浇灌 2 次(中间相隔 3 d),尿素组和对照组用等量水浇灌。之后,对所有盆栽浇灌清水,每周 2 次,每次 500 mL,生长时间为 50 d。

1.8 小麦、西红柿干质量、鲜质量测定

取 500 mL 烧杯,洗净、烘干、称量,记录杯质量。剪取盆栽中生长 50 d 的小麦或西红柿地上部分的全部生物质,分别放入事先准备好的烧杯中,称质量,计算出质量差,为小麦或西红柿的鲜质量。把盛有小麦或西红柿的烧杯放入烘箱中,70 ℃烘干至恒质量,称质量,计算出质量差,为小麦或西红柿的干质量。

1.9 土壤氮含量测定

土壤氮含量采用半微量开氏法^[15]测定。

1.10 蓝藻和尿素肥料对土壤含氮量影响试验设计

本试验选择的库布其当地的沙土,土壤含氮量 0.017%。取直径 18 cm 花盆,处理方法同“1.7”节中的尿素组和藻肥组。按时分别取尿素组和藻肥组花盆中 2 cm 深度的沙土,测定其土壤的总氮含量,测定方法见“1.9”节。

2 结果与分析

2.1 固氮鱼腥藻 119 形态观察

图 1 是固氮鱼腥藻 119 培养 7 d 后的光学显微镜照片。从照片可以看出:固氮鱼腥藻 119 菌丝单一,细胞呈球形或圆柱形,异形固氮细胞明显。异形细胞是蓝藻固氮的场所^[1],蓝藻在缺氮培养基中生长,自身需要的氮全部来自异形细胞固定大气中的氮气。培养 22 d 的固氮鱼腥藻 119 含氮量为 7.2%(干质量)。

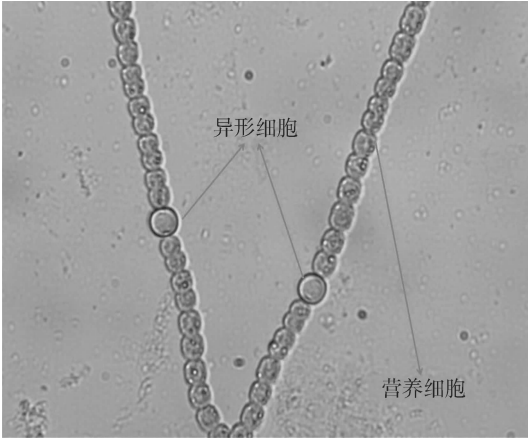


图1 固氮鱼腥藻 119 形态观察

2.2 固氮鱼腥藻 119 生长规律

固氮鱼腥藻 119 生长速度较慢,需要 22~24 d 进入成熟期(图 2)。该藻在生长过程中伴随大量胞外多糖产生,并团聚在一起。当该藻种作为肥料施用到土壤中,胞外多糖有助于细胞适应外部环境,进一步在土壤中繁殖。肥效试验所用的蓝藻肥料是培养 22 d 的固氮鱼腥藻 119,此时该藻种活性和生物量都比较高,作为藻肥的蓝藻含氮量为 7.2%(干质量),培养 22 d 的生物量为 0.7 g/L。

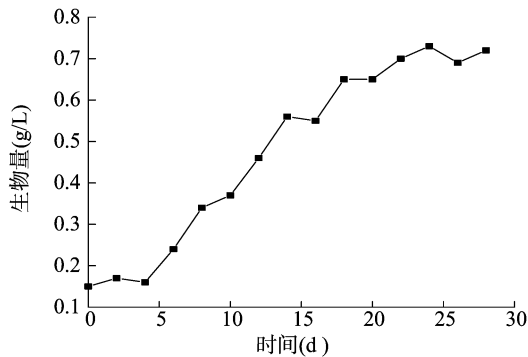


图2 固氮鱼腥藻 119 的生长曲线

2.3 固氮鱼腥藻 119 作为生物肥料在小麦上的肥效

蓝藻肥料浇灌后,会在土壤表面形成聚集,1 周后会形成蓝绿色的结皮,藻种会在土壤中继续生长固定空气中的氮气,持续提供给小麦作物肥料。

从图 3 中可以看出,50 d 后,加入蓝藻肥料的小麦更加茂密,颜色相对更绿,叶片较宽,基本没有黄叶;对照组生长较慢,叶子很窄,颜色偏黄绿,植株很小;尿素组枯叶较多,植株已经抽穗。从整个试验来看,由于沙土肥力很差,15 d 后对照基本停止生长;施用尿素化肥的小麦在前半个月相比于对照和蓝藻肥料生长迅速,随着肥力匮乏,到后期黄叶增多,40 d 后开始抽穗。蓝藻肥料施用后半个月内,相比于对照组差异不大。但半个月后肥效开始明显体现。蓝藻肥料特点为肥效比较缓慢,施用后期效果明显,且肥力持久。原因在于蓝藻固氮在细胞体内完成,对作物供氮需要蓝藻细胞死亡释放或代谢释放,所以比较缓慢。蓝藻施用到土壤中后,部分藻体可以持续存活并利用光能继续繁殖,体现到作物上表现为持久的肥效。

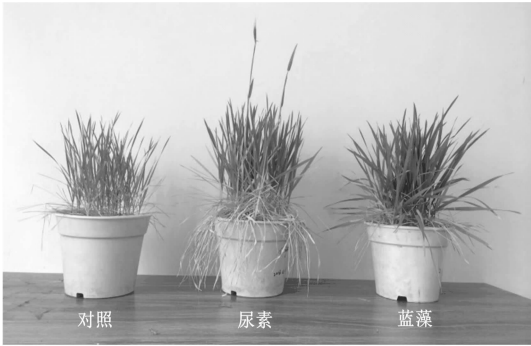


图3 固氮鱼腥藻 119 肥料对小麦的肥力效果

从图 4 小麦试验的鲜质量和干质量对比可以看出,固氮鱼腥藻肥料明显优于不施加肥料的对照组,鲜质量为 33.7 g,是对照组的 3 倍,干质量为 10.4 g,是对照组的 2 倍。蓝藻肥料相比于尿素,鲜质量和干质量略低,从生长状态来看,如果延长生长时间,蓝藻肥料更有优势。对于小麦来说,固氮鱼腥藻是非常好的生物肥料,基本可以代替氮肥尿素。

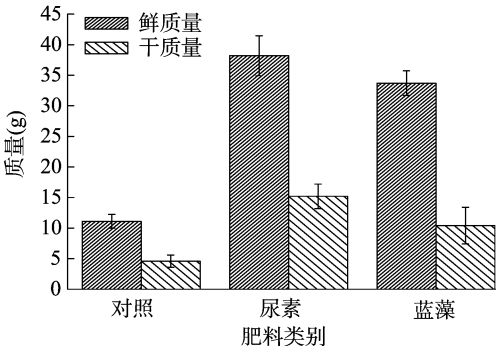


图4 固氮鱼腥藻肥料对小麦的影响

2.4 固氮鱼腥藻 119 作为生物肥料在西红柿上的肥效

固氮鱼腥藻肥料在西红柿上的表现更为突出。从图 5 可以看出,施用蓝藻肥料的西红柿植株明显高于对照组和羊粪组,与尿素组高度相当,但枝叶多茂,更加粗壮。西红柿等果实类作物,在生长周期中需要更多的肥料。一般种植过程中多采用农家肥和化肥混合且多次施用。在没有肥料的情况下,西红柿秧苗生长基本停滞;尿素组在移栽后 1 个月内一直长势迅猛,后期开始乏力,秧苗较细;羊粪和蓝藻组前期肥效都较慢,半个月后开始快速生长,羊粪组 40 d 后高度不再增加,而藻肥组持续生长,肥效非常显著。



图5 固氮鱼腥藻肥料对西红柿的肥力效果

图6是对西红柿鲜质量和干质量的对比,施加蓝藻肥料的西红柿鲜质量为87.7 g,是空白对照的15倍,是羊粪和尿素的2倍还多;蓝藻肥料组干质量为11.4 g,是空白对照组的14倍。说明蓝藻肥料对于改良沙漠土壤效果十分明显。固氮鱼腥藻肥料在西红柿中的表现完全优于尿素和羊粪,可以代替现有的化学肥料。

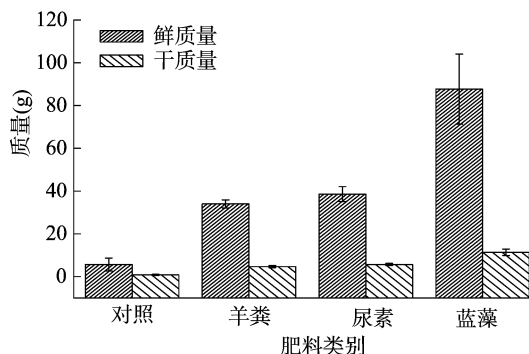


图6 固氮鱼腥藻肥料对西红柿的影响

2.5 固氮鱼腥藻肥料对土壤含氮量的影响

从图7可以看出,尿素刚施入土壤中,土壤含氮量较高,达到0.083%,但之后迅速下降,3 d后下降到0.064%,6 d后下降到0.055%。尿素刚施入土壤中氮含量较高,主要以水径流和气体挥发的形式损失^[10]。之后土壤中氮含量下降缓慢。而固氮蓝藻肥料相反,在刚施用阶段土壤氮含量很低,只有0.023%,之后开始逐渐增加,到30 d土壤氮含量达到0.066%,增速开始变缓,60 d后达到平衡点,氮含量为0.073%。

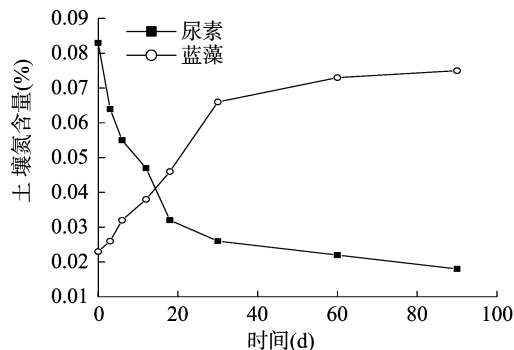


图7 尿素和蓝藻肥料对土壤含氮量的影响

对照组表现差别不大,原因在于蓝藻施用15 d内,土壤中的氮含量没有很大改善。15 d后,施用藻肥的土壤氮含量快速增加,小麦开始快速生长。“2.3”节和“2.4”节的试验结果都与本节试验数据吻合。

施用蓝藻肥料的土壤在90 d后,土壤含氮量可以维持在0.075%左右,而施用尿素的土壤在90 d后,土壤含氮量基本回到最初的水平。在本试验选用的沙土中,施用蓝藻肥料90 d后,土壤含氮量提高416%。

3 结论与讨论

固氮鱼腥藻119在BG11缺氮培养基中22~24 d进入生长期成熟期。成熟期的藻液可以直接或浓缩后作为肥料施用的土壤中,该藻可以在土壤中持续存活并生长,并不断固定空气中的氮气,作为氮肥分泌到土壤中。

固氮鱼腥藻肥料肥效比较缓慢,但十分持久。该肥料使用后15 d内几乎没有效果,但15 d后作物生长好转。生长50 d的小麦,蓝藻肥料组鲜质量是对照组的3倍,干质量是对照组的2倍。生长50 d的西红柿,蓝藻肥料组的鲜质量为87.7 g,是空白对照的15倍,是羊粪和尿素的2倍还多;蓝藻肥料组干质量为11.4 g,是空白对照组的14倍。蓝藻肥料不仅可以应用在稻田中,在沙地中仍然有优良的表现。验证蓝藻的田间肥效试验,如何形成有效的蓝藻养殖施肥模式和经济效益分析等方面,需要进一步研究。

施用蓝藻肥料的土壤在90 d后,土壤含氮量可以维持在0.075%左右,而施用尿素的土壤在90 d后,土壤含氮量基本回到原始土壤含氮量水平。在本试验选用的沙土中,施用蓝藻肥料90 d后,土壤含氮量提高416%。该藻在土壤中的生长繁殖固氮规律和对土壤有机质等方面的影响还有待进一步研究。

我国尿素化肥的利用率只有30%~40%,且对土壤和环境都有很大的负面作用^[10]。蓝藻肥料不但可以提供植物生长所需要的氮肥,而且能够保持土壤含氮量长期保持较高水平,未来应用前景广阔。

参考文献:

- [1]李 R E. 藻类学[M]. 段德麟,胡自民,胡征宇,等译. 4版. 北京:科学出版社,2012:37-69.
- [2]常锋毅,潘晓洁,沈银武,等. 藻类在农业生产中的资源化利用[J]. 华中农业大学学报,2014,33(2):139-144.
- [3]Naveen K S, Sri P T, Keshwanand T, et al. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges[J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(6):1059-1081.
- [4]de P K. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in ricefield[J]. Biological Sciences, 1939, 127:121-139.
- [5]John R B. Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue-green algae[J]. Enzyme&Microbial Technology, 1979, 1(2): 83-90.
- [6]夏建明. 固氮蓝藻稻田应用技术研究[D]. 上海:上海交通大学, 2007:48-66.
- [7]Mohamed E H, Mostafa M E, Amal H E, et al. Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 8(46): 861-875.

“2.3”节试验结果显示,施用蓝藻肥料的小麦15 d内与

马长中, 辜雪冬, 池福敏, 等. 西藏自治区产碱性弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 502–504.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.144

西藏自治区产碱性弹性蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离及鉴定

马长中, 辜雪冬, 池福敏, 罗章, 杨林

(西藏农牧学院食品科学学院, 西藏林芝 860000)

摘要:从西藏自治区不同海拔地区的屠宰场土壤中分离得到 180 株菌株, 经过初筛和复筛, 获得 1 株产碱性弹性蛋白酶较高的菌株 XZJ4, 结合生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

关键词:碱性弹性蛋白酶; 分离; 鉴定; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0502-03

弹性蛋白酶是一种以水解不溶性弹性硬蛋白为特征的广谱蛋白水解酶, 是一种肽链内切酶^[1-2], 广泛存在于动物胰脏和微生物类群中, 细菌、真菌、放线菌中均存在。弹性蛋白酶是一种经济价值较高的酶制剂^[3-4]。弹性蛋白酶作为一种水解专一性较广的内肽酶, 对很多蛋白质均有水解能力^[5]。当弹性蛋白与其他蛋白共存时, 它会优先水解弹性蛋白, 弹性蛋白酶可作为理想的肉类嫩化剂应用于食品工业和日常生活中^[6-7]。此外, 弹性蛋白酶还可应用于农副产品深加工、高蛋白食品制作、罐头工业, 也可作为益生菌保健食品的促菌剂和婴儿食品的强化剂^[8-10]。胰脏是弹性蛋白酶的主要来源, 由于脏器资源不足, 胰弹性蛋白酶一直供不应求。由微生物发酵生产弹性蛋白酶成本低、产量大、设备利用率高, 且不受原料来源的限制; 因此, 利用微生物发酵生产弹性蛋白酶是一条有效途径。目前, 由微生物发酵法生产弹性蛋白酶, 关键在于筛选到产弹性蛋白酶的高产菌株。本研究首次从西藏自治区不同海拔地区的屠宰场附近采集土样, 并从中分离得到产碱性弹性蛋白酶的菌株 XZJ4, 结合生理生化特征和 16S rDNA, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

1 材料与方法

收稿日期: 2015-11-14

基金项目: 西藏自治区自然科学基金 (编号: Z2012A076)。

作者简介: 马长中 (1975—), 男, 四川遂宁人, 硕士, 副教授, 主要从事高原特色农畜产品加工及贮藏研究。Tel: (0894) 5826471; E-mail: 414767450@qq.com。

1.1 样品采集

选取西藏自治区林芝市、拉萨市、日喀则市、阿里地区 4 个不同海拔地区的屠宰场, 在其附近的土样中采集样品共 30 份。

1.2 主要试剂

pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 HindⅢ、T₄ DNA 连接酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。小量 PCR 产物试剂盒购自 Omega Bio Tek 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 培养基

培养基的配制参照文献 [11]。

1.4 培养方法

种子斜面及平板培养均于 37℃ 下培养 24 h。进行复筛发酵培养时, 将 20 mL 发酵培养基加入 250 mL 三角瓶中, 接种后置于旋转式摇床, 于 32~37℃、180 r/min 条件下发酵培养 24 h。

1.5 粗酶制备^[12]

将细菌发酵液以 10 000 r/min 离心 10 min, 收集去菌体发酵液进行硫酸铵分级盐析 (30%~65% 饱和度), 将沉淀溶于 0.05 mol/L、pH 值 9.0 的硼酸缓冲液中即为粗酶液。

1.6 酶活力的测定

采用分光光度法^[13]测定弹性蛋白酶活力。称取 10 mg 刚果红-弹性蛋白溶于 1 mL 水中, 加入 1 mL 适当稀释的酶液以及 1 mL pH 值 7.4 的 0.2 mol/L 硼酸缓冲液, 于 37℃ 下振荡反应 30 min; 加入 2 mL pH 值 6.0 的 0.7 mol/L 磷酸钠缓冲液终止反应, 过滤后取上清液, 于波长 495 nm 处测定光密

[8] 黎尚豪, 叶清泉, 刘富瑞, 等. 固氮蓝藻作为水稻肥源的研究[J]. 水生生物学集刊, 1962(1): 55-61.

[9] 黎尚豪. 固氮蓝藻作为水稻肥源的研究[J]. 水生生物学集刊, 1981, 7(3): 417-423.

[10] 尹娟, 费良军, 田军仓, 等. 水稻田中氮肥损失研究进展[J]. 农业工程学报, 2005, 21(6): 189-191.

[11] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 农业生产中的氮肥施用现状及其环境效应研究进展[J]. 土壤通报, 2006, 37(4): 782-786.

[12] Ju X T, Xing G X, Chen X P, et al. Reducing environmental risk by

improving N management in intensive Chinese agricultural systems [J]. PNAS, 2009, 106(9): 3041-3046.

[13] 栗铁申. 我国氮肥施用现状、问题和对策[J]. 农民科技培训, 2010, 7: 23-24.

[14] Parker F P, Javier Z C. Available nitrogen from animal manures [J]. California Agriculture, 1981, 35(7/8): 24.

[15] 谢小玲, 李海锋, 李雪莹, 等. 土壤全氮半微量定氮法与自动定氮仪定氮法的比较分析[J]. 生态环境学报, 2012, 21(6): 1071-1074.