

新型复合生物肥的研制

孙淑荣 隗晓微 阎孝贡 张桂芝 范三微

(吉林省农业科学院土肥所,公主岭 136100)

提 要 复合生物肥是我们近年来在根瘤菌肥研究基础上开发研制的又一新型接种剂,该肥富含多种有益微生物,菌种是经过严格筛选,以固氮菌为主,并具有解磷、解钾功能。同时对优化组合的菌种进行其生理生化特性鉴定,确定它们的有效性指标为:硅酸盐细菌在含钾长石粉的无氮培养基上接种培养 10 d,可使水溶性钾含量增加 131.51%;磷细菌在含有卵磷脂的琼脂平板上,能观察到明显的溶磷圈;固氮菌的固氮酶活性为 $2.05 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{株} \cdot \text{h})$ 。并对菌种的发酵条件进行了探索,摸索出混合发酵液配方。对菌肥的耐贮性、安全无毒性进行了有效测定。

关键词 生物肥;菌种筛选;生化鉴定;混合发酵;生产工艺

1 材料与方 法

1.1 菌种的分离、筛选、优化组合及有效性指标

菌种分离,采用《土壤微生物研究法》^[1]进行;筛选采用蛭石盆栽初筛、土壤盆栽复筛及田间效果测定的方法;优化组合采用多种处理土壤盆栽方法;各种菌的有效性指标测定均按 NY 227-94 的方法进行。

1.2 菌种主要生物学及生理生化特性鉴定方法

采用《一般细菌常用鉴定方法》^[2]和 Gordon et al (蔡妙英等译) The Genus Bacillus (芽孢杆菌属)的方法进行。

1.3 复合生物肥的研制及检测方法

复合生物肥采用菌种复配、草炭吸附的方法,产品检测采用农业行业标准 NY 227-94 的方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离、筛选、优化组合及有效性指标

确定筛选目标:选出多种具有明显优势,能在土壤中长期起作用,而不被土壤中自然微生物区系所抑制,生命力强,具有多种功能的微生物生态群体。

首先从吉林省和内蒙古的 6 个县(市)采集不同土壤样品 48 个,共分离芽孢杆菌 164 株,固氮菌 26 株,经蛭石盆栽初筛、土壤盆栽复筛及田间效果测定后获得优良菌株 5 株。

将它们进行不同组合处理,有单因子、多因子与 PGPR 组合,然后进行玉米、水稻、大豆的盆栽接种试验。结果以固氮菌+磷细菌+钾细菌这一组合效果最好。

菌种的有效性指标:固氮菌的固氮酶活性为 $2.05 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{株} \cdot \text{h})$;磷细菌在含有卵磷脂的琼脂平板上,能观察到明显的溶磷圈;钾细菌在含钾长石粉的无氮培养基上接种,并

培养 10 d, 可使水溶性钾含量增加 131.57%。

2.2 菌种主要生物学与生理生化特性的鉴定结果

2.2.1 拜氏固氮菌

菌落圆形凸起, 边缘整齐, 半透明, 表面湿润光滑, 在洋葱培养基上生长物有特征性的水溶性褐色色素。

幼年培养中的个体为杆状, 大小为 $1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}\times 3\sim 7\ \mu\text{m}$, 周生鞭毛, 以后逐渐缩短, 成椭圆形或圆形, 生荚膜, 革兰氏染色阴性反应, 不生芽孢。好气, 中温性。葡萄糖、蔗糖、糊精、甘露醇、淀粉、安息香酸都是良好的碳源。利用铵盐和硝酸盐等无机氮化物, 不利用有机氮化物, 如蛋白胨、尿素等。

2.2.2 解磷巨大芽孢杆菌

细胞呈革兰氏阳性杆状, 大小为 $1.0\sim 1.2\ \mu\text{m}\times 4.5\sim 5.5\ \mu\text{m}$, 菌落圆形凸起, 边缘完整, 褐色, 表面光滑, 不透明, 芽孢中生, 芽孢椭圆形, 孢囊不膨大。胞内有聚 β -羟基丁酸颗粒 (PHB), 接触酶和氧化酶皆阳性。在 7% NaCl、pH 5.7 中皆能生长。不产乙酰甲基甲醇, 硝酸盐不能还原至亚硝酸盐。不能在厌氧培养基中生长, 而营好氧生活, 能水解淀粉, 对葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露醇产酸, 卵磷脂酶阴性。

2.2.3 胶质芽孢杆菌

菌落圆形凸起, 边缘完整, 表面湿润光滑, 无色半透明, 细胞呈革兰氏阳性杆状, 大小为 $1.0\ \mu\text{m}\times 2.5\sim 3.6\ \mu\text{m}$ 。有厚的荚膜, 胞内有椭圆形芽孢, 孢囊不膨大。在 16~18 h 的细胞内有聚 β -羟基丁酸颗粒 (PHB)。接触酶阳性, 氧化酶阳性。不产乙酰甲基甲醇, 在 7% NaCl、pH 5.7 溶菌酶皆不生长。不但能在厌氧培养基中生长, 还能营好氧生活。对葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖和木糖产酸。硝酸盐不能还原为亚硝酸盐。

2.3 复合生物肥的研制、生产工艺流程及产品检测结果

2.3.1 复合生物肥的研制

菌种的发酵条件: 培养基从 10 个配方中筛选较适宜的 4 号发酵培养基。该培养基原料易得, 价格低廉, 菌体生长良好。培养温度在 20~50℃ 范围内均能生长, 在 10℃ 以下, 50℃ 以上, 均不能生长, 最适温度为 28~32℃。pH 值在 6.0~8.5 范围内均能正常生长, 最适 pH 为 6.5~7.5。

菌种的发酵培养: 经种子罐培养和二级发酵罐培养观察, 3 个菌种的生长基本同步, 对数生长期在 15~20 h, 并且菌株在二级发酵中的生长趋势同种子培养基本一致。3 种菌的发酵时间一般在 20~25 h。

载体: 以草炭作为载体, 过 80 目筛, 每袋 500 g, 菌液与草炭比例大约为 1:4。

复合生物肥的特性: ①耐贮性。菌肥在室温贮存 1 年以上, 测定结果表明, 磷细菌、钾细菌的存活率高达 95% 左右, 固氮菌高达 85% 左右, 表明菌株有较好的耐贮存性。②安全无毒。经沈阳病毒研究所进行急性毒性和接触毒性测定, 均属安全无毒, 认为使用复合生物肥是安全的。

2.3.2 生产工艺流程

首先将草炭晾晒风干→粉碎→过筛(80 目)→灭菌(大工业微波炉)。

将菌种移接到试管斜面→扩大到三角瓶→种子罐→发酵罐, 有为种子罐和发酵罐提供消毒空气的通气系统。将灭菌的草炭拌上培养好的菌液, 充分吸附, 装袋, 即成产品。

2.3.3 产品检测结果

外观为黑褐色、粉状、湿润、松散,含水量为40%,载体细度及硬度为80目,松软。有效活菌总数为每克草炭含有有效活菌数2亿,杂菌率 $<15\%$ 。有机质含量为67%,pH 6.5~7.0。重金属元素及含量为:铬16.37 mg/kg,镉0.45 mg/kg,铅10.11 mg/kg,汞1.94 mg/kg,砷4.05 mg/kg。大肠杆菌值 >1.1 g,蛔虫卵死亡率为100%。有效期为10个月。

3 小 结

3.1 菌种的分离和筛选

通过对菌种的分离、初筛和复筛,筛选出的优化组合为固氮菌+磷细菌+钾细菌。通过菌种生理生化特性鉴定,固氮菌为拜氏固氮菌,磷细菌为解磷巨大芽孢杆菌,钾细菌为胶质芽孢杆菌。

3.2 3种菌株的有效性指标

固氮菌:固氮酶活性为 $2.05 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{株}\cdot\text{h})$ 。磷细菌:在含有卵磷脂的琼脂平板上,能观察到明显的溶磷圈。钾细菌:在含钾长石粉的无氮培养基上接种钾细菌,培养10 d,可使水溶性钾含量增加131.51%。

3.3 复合生物肥的研制

培养基从10个配方中筛选出较适宜的4号发酵培养基,培养温度在 $20\sim 50^\circ\text{C}$ 内均能生长,最适温度为 $28\sim 32^\circ\text{C}$,最适pH为6.5~7.5。经种子罐和二级发酵罐培养观察,3种菌株的生长基本同步,对数生长期在 $15\sim 20$ h,发酵时间 $20\sim 25$ h。

3.4 产品检测结果

每克草炭含有有效活菌数为2亿,杂菌率 $\leq 15\%$,重金属含量均未超标,按照国家农业行业标准衡量为合格产品。

参 考 文 献

- 1 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著.土壤微生物研究法.1985,54~56
- 2 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978

Development of A New Type of Compound Bio_ fertilizer

Sun Shurong Kui Xiaowei Yan Xiaogong et al.

(Soil Fertilizer Research Institute Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100)

Abstract Recently, we have developed a compound bio-fertilizer, a new type of inoculants, based on research of Rhizobia fertilizer. It contains many kinds of beneficial microorganisms, whose strains are screened rigorously. Except Pseudomonas and Silicate bacteria, Azotobacter is the chief among these strains. At the same time, the optimum and composite strains are identified in physiological and biochemical characters, and established their effective targets. As the result, about Silicate bacteria, soluble potassium increases 131.51% in 10 days on the no nitrogen culture medium which contains feldspar powder;