



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104844346 B

(45)授权公告日 2018.01.23

(21)申请号 201510186594.4

(22)申请日 2015.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104844346 A

(43)申请公布日 2015.08.19

(73)专利权人 天津师范大学

地址 300387 天津市西青区宾水西道393号

(72)发明人 多立安 赵树兰 刘春湘

(74)专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司  
12207

代理人 朱红星

(51)Int.Cl.

C05G 3/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101884278 A,2010.11.17,

CN 102174403 A,2011.09.07,

US 2012060574 A1,2012.03.15,

钱劲华等.不同粒径垃圾堆肥对高羊茅抗旱性的影响.《天津师范大学学报(自然科学版)》.2011,第31卷(第1期),第75-79页.

徐妙芳等.2种硅酸盐细菌对PEG模拟水分胁迫下高羊茅种子萌发的影响.《草业与畜牧》.2009,(第8期),第7-10页.

张彦涛等.旱生植物内生细菌的分离及耐旱菌株的筛选鉴定.《食品科学》.2012,第33卷(第5期),第124-128页.

多立安等.垃圾堆肥复合菌剂对于旱胁迫下草坪.《生态学报》.2011,第31卷(第16期),第4717-4724页.

审查员 郭培俊

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法

(57)摘要

本发明公开了一种采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法。它是从生活垃圾堆肥中通过分离提取出合适的有益微生物菌株,通过耐旱强化获得更为高效的微生物菌剂,将其与纳米堆肥联合施用于草坪基质,研究其对于旱胁迫下草坪植物的耐旱性,为纳米堆肥联合微生物菌剂在草坪草抗旱性方面的应用提供依据。实验结果表明:在干旱胁迫下,纳米堆肥联合微生物有助于高羊茅的生长,提高叶片保护酶活性,增强植株对于旱胁迫的适应能力,中度胁迫和重度胁迫时,节水率分别为43.10%和52.39%。

1. 一种采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法,其特征在於按如下的步骤进行:

以灭菌后的土壤为基质进行草坪植物栽培试验,纳米堆肥采用混施的方式施入土壤基质,实验时基质用量为 $9400\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ,草皮基质厚度为15 mm,高羊茅草种播种量为 $160\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ,将种子浸泡24h后均匀播洒于基质表层,首先进行黑暗处理,萌发后植株生长初期,每天统一定量给水,以保持培养基质水分状况良好,生长第10d时分别浇入15ml强化耐旱微生物菌剂,生长15d后进行干旱胁迫,按照胁迫程度进行称重浇水,以维持在胁迫范围内,干旱胁迫持续25d后取样,进行生理生态指标测定,实验期间光照强度为 $400\text{--}600\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,室内的相对湿度为50–55%,温度为20–23℃,最后将草坪植物齐基质刈割,测量地上鲜重,根部用蒸馏水冲洗干净,置于烘箱中105℃条件下杀青30 min,80℃烘干至恒重,测量地上和地下干重;所述的干旱胁迫指的是:中度干旱胁迫、重度干旱胁迫;其中中度干旱胁迫:基质含水量为60%–40%,重度干旱胁迫:基质含水量为40%–20%,土壤和30–35nm纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml强化耐旱微生物菌剂;所述的强化耐旱微生物菌剂指的是:蜡样芽孢杆菌:赖氨酸芽孢杆菌:粘红酵母按体积比1:1:1的配制;所述的强化耐旱微生物菌剂采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法,在强化过程中,视OD600增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%。

2. 权利要求1所述采用强化耐旱微生物菌剂联合纳米堆肥提高草坪草抗旱性的方法在增强高羊茅逆境下的适应能力方面的应用。

3. 权利要求1所述采用强化耐旱微生物菌剂联合纳米堆肥提高草坪草抗旱性的方法在促进高羊茅的生长,提高叶片保护酶活性方面的应用。

## 采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于环境保护技术领域,涉及一种采用强化耐旱微生物菌剂联合纳米堆肥提高草坪草抗旱性的方法。

### 背景技术

[0002] 纳米科学技术(Nano-ST)是20世纪80年代末期崛起的一项新科技,它主要研究结构尺度在( $10^{-7}$ - $10^{-9}$ m)范围内物质的性质及其应用。因为纳米材料具有界面表面界面效应、小尺寸效应、宏观量子隧道效应和量子尺寸效应等基本特征,所以,出现了许多传统材料不具备的奇异特性。纳米材料在吸收、催化、磁效应和敏感特性方面都表现出不同于传统材料的特性,可与多个领域高度交叉,包括物理、化学、电子学、材料科学和生物学,在高科技应用上显示出广大的潜力,所以,纳米材料的应用已经愈来愈受到科学家的关注。我国政府十分重视纳米技术的研究,并将纳米结构和纳米材料视为纳米技术的关键而加以优先支持。2012年,中国工业和信息化部根据《国家“十二五”战略性新兴产业发展规划》的精神,发布《新材料产业“十二五”发展规划》,将纳米材料列为前沿新材料领域,并明确指出:中国将加大纳米技术研究,积极地推动纳米材料在新能源、环境治理、节能减排和生物医用等领域研究利用。

[0003] 国外对于纳米材料的研究主要集中于对纳米材料安全性的研究,主要研究的五大问题是:皮肤对纳米材料的吸收及其对皮肤的伤害;饮用含纳米颗粒水的后果;纳米颗粒对动物肺部的影响;已变成水中沉积物的纳米颗粒对周围环境的影响。2005年5月1日至4日,欧共体内部在德国波恩举行“欧洲纳米生物效应会议”。会议讨论了纳米颗粒的形成、释放,在环境中的运动和检测方法,它的急性毒害作用、慢性毒害作用以及细胞水平和分子水平的影响,如对血细胞、肺部细胞、免疫细胞、DNA损伤、基因表达的影响等。国内还发展了纳米材料对植物的影响,纳米肥料由中国农科院土壤肥料研究所张夫道研究员提出,并在国家“863”项目中立项。纳米肥料是纳米生物科技的一个分支,是用纳米材料技术和医药微胶囊技术构建改性而制成的全新肥料,分为纳米材料包膜、胶结缓释控释肥料与纳米结构肥料。众所周知,滥用肥料导致的地下水污染已越来越严重,如何提高肥料利用率成为解决问题的重点,纳米材料表面原子数目占完整粒子原子总数的80%以上,因为表面原子周围缺少相邻的原子,含有许多悬空键,所以具有不饱和性,很容易与其他原子相结合而稳定下来,从而表现出非常高的化学活性。与肥料结合能明显提高肥料的利用率,一方面是由于纳米材料的磁效应,能够促进养分被植物吸收,刺激植物生长发育,并且还能提高植物体内多种酶的活性。另一方面,是因为其表面效应,使纳米肥料表面能和表面结合能增大,帮助其在土壤环境中被植物根系吸收,肥料使用的效果得到提高。有研究表明,添加纳米碳肥料增效剂能有效减缓土壤有效养分的下降,提高水稻产量,增产幅度在1.9%-3.5%之间。纳米碳对水稻产量与氮肥利用率的影响,也证明了施用纳米碳粉可显著提高水稻产量,同时,在适宜施氮量条件下,加施纳米碳粉有助于水稻氮肥利用率的提高。纳米材料胶结包膜型缓/控释肥料对作物产量和品质的影响,结果表明,纳米材料胶结包膜型缓/控释肥料均有助于小麦

和玉米子粒产量和蛋白质产量的提高。目前研究的纳米肥料多数为纳米材料增效肥或纳米材料包膜肥,而将肥料本身加工到纳米粒径应用于草坪植物逆境胁迫的研究,尚无文献报道。

[0004] 微生物肥料又称为菌肥、生物肥料,主要作用表现在帮助作物营养吸收、提升化肥利用率和农产品品质、增强作物抗逆性等方面。微生物肥料一般可分为两类,一类是微生物通过自身的生命活动,增加可供植物吸收的营养元素;另一类,能够通过微生物生命活动的次生代谢分泌激素,来促进植物生长和提高植物的抗逆性。如固氮微生物能够通过固氮作用增加土壤氮素含量,微生物可以通过生命活动提高土壤中营养元素的转化和吸收,是大多数微生物肥料的主要功能。此外,一些有益微生物可以通过自身的代谢活动产生多种糖类物质,这些糖类物质不仅能与土壤中的胶类物质有机结合在一起,同时还可以与植物自身产生的粘液结合在一起,起到改良土壤的作用。微生物菌剂还具有改善作物生长状况,增强植物抗性等作用。目前大多数研究已表明,微生物制剂能促进植物生长和营养元素的吸收。有研究者将其应用于水稻研究,结果表明,与常规施肥相比,施加生物菌肥能有效促进水稻产量的增加。也有人将筛选出的七种植物促生真菌应用于向日葵的培养研究,结果证明,真菌可以明显促进其初期生长,并能有效抑制霜霉病的发生。综上所述,目前有关微生物的研究多侧重于有益微生物的提取、鉴定及应用,但将有益微生物进一步强化后应用于草坪植物逆境生长的研究尚无文献报道。

[0005] 草坪建植体系是集生态调控、美化环境和文化娱乐等多种功能为一体的生态工程。作为城市园林绿化的重要组成部分,草坪绿地是衡量经济发展程度的标准之一,也是衡量现代化城市的标准之一,是现代城市社会发展与经济实力的一个有力体现,草坪建植体系的构建对于改善城市投资环境、招商引资、促进旅游等各个方面都起着不可忽略的作用。草坪在带来景观和美化效果的同时,在维系生态系统平衡方面也发挥着重要作用。首先,它能够净化空气、杀菌消毒,草坪通过光合作用吸收 $\text{CO}_2$ 放出 $\text{O}_2$ 保持空气中 $\text{CO}_2$ 和 $\text{O}_2$ 的平衡,草坪还能稀释、分解、吸收和固定大气中的有毒气体、致癌物质和某些重金属气体等有毒物质,通过光合作用变害为利。其次,草坪能够保持水土、维持生态平衡。草坪能致密覆盖地表的草层,并且密集根系能有效固着表土,防止地表径流的形成,降低表土被带走的可能性。另外,草坪还可以减缓太阳辐射,有效降低地表温度、增加空气湿度。

[0006] 近年来,环境问题日益严重,草坪绿地在保护人类生存环境及人类身心健康方面有着十分重要的生态和环保价值。但草坪草生存于自然界,地理分布范围广泛,生长繁殖常遭受不良环境的影响,如在干旱环境中都有分布。其中干旱是制约草坪草生长的主要环境胁迫因子之一。干旱导致植物体内水分不足,抑制植物生长,更为严重的是引起植株机械性损伤从而致使植株死亡。我国地域辽阔,气候多样,其中47%面积为干旱及半干旱地区,水资源短缺已成为我国大部分地区甚至全球性的问题,极大地限制了绿地草坪的生长建植,加重了草坪生产管理的难度。水分是保证草坪草生长的重要因素,草坪水分不足可使草坪加速老化,缩短草坪使用年限。加之,城市人工培植草坪耐旱能力与天然草坪相比相对较差,其草坪根系浅,摄取水分能力不足,需要进行人工灌溉。在我国北方城市,每平方米草坪的年灌水量大约为 $0.6-1.0 \text{ m}^3$ 。所以,在水资源紧张环境不断恶化的今天,草坪建植所面临的巨大挑战是水资源的调配与利用。因而草坪草抗旱性研究对节约灌溉用水,促进干旱环境草坪植物的建植,缓解水资源危机就显得至关重要。

[0007] 针对以问题,目前研究主要集中于选取抗逆性强的草坪植物、施用高效肥料、施用保水剂和改良剂等措施。纳米肥作为一种新型的高效肥料,在植物逆境胁迫方面受到越来越多的关注。纳米肥料是一种特殊的高效肥料,其粒子的表面积、表面能及表面结合能都相对较大,有助于其在土壤环境中被植物的根毛或根尖部分吸附,其特有性能有可能解决肥料利用率、作物增产与植物抗性等问题。目前关于纳米肥料的研究多数为纳米材料增效肥或纳米材料包膜肥,而将肥料本身加工到纳米粒径应用于草坪植物的研究,也尚无相关技术应用的报道。生活垃圾堆肥是一个高渗体系,其中的微生物对逆境有一定的适应能力,将其中有益微生物菌剂进一步强化后应用于草坪逆境建植具有重要意义。基于以上考虑,为了研究纳米堆肥及其有益微生物在草坪建植中的应用效果,本文中垃圾堆肥经纳米加工技术加工到30nm左右,并从生活垃圾堆肥中分离提取出合适的有益微生物菌株,通过进一步抗性驯化,获得更为高效的强化微生物菌剂,将其按一定的体积比例混合后,制成复合微生物菌剂,与纳米堆肥联合应用于干旱胁迫逆境胁迫下的草坪建植,通过探索其对逆境胁迫下草坪植物生理生态特性的影响,以期强化微生物联合纳米堆肥在逆境草坪建植中的应用,促进逆境环境草坪植物的建植提供理论依据。近年来,作为城市园林绿化的重要组成部分,草坪绿化所发挥的生态效益和存在的经济价值日益受到人们的重视。但草坪建植干旱条件,影响其生长发育和各种生理代谢过程,加之管理上的经济因素考虑,研究草坪建植节水技术以及提高其抗旱性具有重要意义。纳米肥是一种新型的高效肥料,其粒子的表面积、表面能及表面结合能都相对较大,有助于其在土壤环境中被植物的根毛或根尖部分吸附,其特有性能有可能解决肥料利用率、作物增产与植物抗性等问题。纳米级材料胶结包膜型缓/控释肥料对提高冬小麦的产量和品质亦具有明显的促进作用。但是,大部分文献都是直接采用已研制出的纳米材料来研究对作物的影响,真正运用纳米技术把垃圾堆肥加工到纳米级别制成纳米肥料,应用于植物抗旱性方面的研究,尚无文献报道。生活垃圾堆肥是一个高渗体系,其中的微生物对逆境有一定的适应能力,有益微生物能够促进植物对营养物质的吸收,提高植物抗性。

## 发明内容

[0008] 本发明从生活垃圾堆肥中通过分离提取出合适的有益微生物菌株,通过耐旱强化获得更为高效的微生物菌剂,将其与纳米堆肥联合施用于草坪基质,研究其对干旱胁迫下草坪植物的耐旱性,为纳米堆肥联合微生物菌剂在草坪草抗旱性方面的应用提供依据。

[0009] 为实现上述目的本发明公开了如下的技术内容:

[0010] 一种采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法,其特征在于按如下的步骤进行:

[0011] (1) 纳米堆肥的制备:将生活垃圾堆肥105℃烘干至恒重,将垃圾堆肥加工研磨制成30-35nm纳米堆肥,备用;

[0012] (2) 耐旱微生物菌剂的制备

[0013] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;

[0014] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物耐低温强化是将不同浓度梯度( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ )涂布在相应的培养基上(即牛肉膏蛋白胨培养基,高氏I号培养基和马丁氏培养基)放置在人工气候培养箱中培养2周,温度为10℃;

[0015] 混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法。未经过强化的混合菌群一般在无PEG6000的条件下生长较好,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;即在本实验中PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群,含有蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母;

[0016] (3)复合耐旱微生物菌剂的配制

[0017] 将筛选得到的三种强化耐旱微生物在相应的液体培养基中扩大培养,蜡样芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养,粘红酵母在28℃,220r/min培养,培养后蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母按体积比1:1:1的配制成复合微生物菌液,稀释100倍备用;

[0018] (4)草皮基质组配与强化微生物联合纳米堆肥应用

[0019] 中度干旱胁迫:60%~40%,重度干旱胁迫:40%~20%,每个胁迫设3个处理,4次重复,两个胁迫所设处理相同,分别为:

[0020] 1)以100%土壤为对照基质并加入15 ml空白培养基

[0021] 2)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml空白培养基

[0022] 3)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml强化耐旱微生物菌剂

[0023] (5)以灭菌后的土壤为基质进行草坪植物栽培试验,纳米堆肥采用混施的方式施入土壤基质,实验时基质用量为9400g $m^{-2}$ ,草皮基质厚度为15 mm,高羊茅草种播种量为160g $m^{-2}$ ,将种子浸泡24h后均匀播洒于基质表层,首先进行黑暗处理,萌发后植株生长初期,每天统一定量给水,以保持培养基质水分状况良好,生长第10d时分别浇入15ml灭菌后的空白培养基和强化耐旱微生物菌剂,生长15d后进行干旱胁迫,按照胁迫程度进行称重浇水,以维持在胁迫范围内,干旱胁迫持续25d后取样,进行生理生态指标测定,实验期间光照强度为400-600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,室内的相对湿度为50-55%,温度为20-23℃,最后将草坪植物齐基质刈割,测量地上鲜重,根部用蒸馏水冲洗干净,置于烘箱中105℃条件下杀青30 min,80℃烘干至恒重,测量地上和地下干重。

[0024] 其中:PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群。

[0025] 本发明所述的材料有:选取籽粒饱满、大小均匀的多年生高羊茅(*Festuca arundinacea* L.)种子为试验材料;

[0026] 生活垃圾堆肥来自天津市小淀堆肥厂,基本理化性质为:pH 7.62,饱和含水量0.76 ml/g,容重0.85 g/ml,全氮5.18%,全钾50.83 g/kg,有效磷77.92 mg/kg,有机质12.12%,将垃圾堆肥去除其中的木头、塑料、金属等杂物,风干后备用;

[0027] 土壤基质剔除杂物,过2mm筛,放置于通风口处2-3d,自然条件下风干,其理化性质

为:pH 7.44,饱和含水量0.58mL /g,有机质4.68%,全氮0.21%,有效磷22.03 mg /kg,全钾45.61g /kg。

[0028] 本发明进一步公开了采用强化耐旱微生物菌剂联合纳米堆肥提高草坪草抗旱性的方法在增强高羊茅逆境下的适应能力方面的应用。

[0029] 本发明更加详细的制备方法如下:

[0030] 1 研制材料与amp;方法

[0031] 1.1 实验材料

[0032] 选取籽粒饱满、大小均匀的多年生高羊茅 (*Festuca arundinacea* L.) 种子为试验材料。

[0033] 生活垃圾堆肥来自天津市小淀堆肥厂,基本理化性质为:pH 7.62,饱和含水量0.76 ml/g,容重0.85 g/ml,全氮5.18%,全钾50.83 g/kg,有效磷77.92 mg/kg,有机质12.12%,将垃圾堆肥去除其中的木头、塑料、金属等杂物,风干后备用。

[0034] 土壤基质取自天津师范大学校园内,剔除杂物,过2mm筛,放置于通风口处2-3d,自然条件下风干,其理化性质为:pH 7.44,饱和含水量0.58mL /g,有机质4.68%,全氮0.21%,有效磷22.03 mg /kg,全钾45.61g /kg。

[0035] 1.2 纳米堆肥的制备

[0036] 将垃圾堆肥105℃烘干至恒重,由秦皇岛市太极环纳米制品有限公司,利用改进的高能球磨技术,通过罐体快速的多维摆动式运动,将垃圾堆肥加工研磨制成纳米堆肥,备用。在电镜下通过粒径分析,纳米堆肥粒径大小分布均匀,平均粒径在30nm左右。

[0037] 1.3 耐旱微生物菌剂的制备

[0038] 1.3.1 菌种的富集

[0039] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群。

[0040] 1.3.2 耐旱微生物的强化

[0041] 混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法。未经过强化的混合菌群一般在无PEG6000的条件下生长较好,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;即在本实验中PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群。

[0042] 1.3.3 强化耐旱微生物的分离及纯化

[0043] 1.3.3.1 稀释涂布平板法

[0044] 1) 倒平板:将牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、高氏I号琼脂培养基、马丁氏(PDA)琼脂培养基高温灭菌,冷却至55-60℃时,在马丁氏琼脂培养基中加入链霉素溶液(最终质量浓度为0.3%),混均匀后分别倒平板。

[0045] 2) 制备混合微生物稀释液:用移液枪吸取1ml强化后的混合微生物菌悬液加入盛有9ml无菌水的大试管中充分混匀,此为10<sup>-1</sup>稀释液,以此类推制成10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>和10<sup>-6</sup>几种浓度的稀释液。

[0046] 3) 涂布:用移液枪分别吸取0.2ml不同浓度的稀释菌悬液准确放入相应培养基平

板中央,每个不同浓度梯度处理重复3次。用无菌玻璃棒在培养基表面轻轻地涂布均匀。

[0047] 4) 培养:牛肉膏蛋白胨平板倒置于37℃培养箱中培养,将含高氏I号培养基和马丁氏培养基(PDA)的平板倒置于28℃培养箱中培养3-5 d。

[0048] 1.3.3.2平板划线分离法

[0049] 挑菌落:将培养后长出的单个菌落分别挑取少许菌苔在新的上述3种培养基上进行划线纯化。直到培养基上长出来的是纯种,如不纯,仍需重复该步骤,最后得到3个菌种。

[0050] 1.3.4强化耐旱微生物的鉴定

[0051] 按照试剂盒的操作手册提取优势菌种的DNA。优势细菌的PCR体系:10×Buffer (with MgCl<sub>2</sub>) 2 μL,dNTP (10mmol/L) 0.4μL,341f (10μmol/L) 1μL,534r (10μmol/L) 1μL,Taq酶 (5u/μL) 0.4μL,模板DNA 1μL,加超纯水定容至终体积20μL。PCR反应条件:94℃5min预变性,94℃变性1min,55℃复性45s,72℃延伸45s,30个循环,72℃延伸10min。引物为341f (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和534r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')。优势真菌的PCR反应体系:10×Buffer (without MgCl<sub>2</sub>) 2 μL,MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 1.6μL,dNTP (10mmol/L) 0.4μL,Geo11 (10μmol/L) 0.4μL,GeoA2 (10μmol/L) 0.4μL,Taq酶 (5u/μL) 0.2μL,模板DNA 1μL,加超纯水定容至终体积20μL。PCR反应条件:94℃4min预变性,94℃变性1min,54℃复性1min,72℃延伸2min,30个循环,72℃延伸7min。引物为GeoA2 (5'-CCA GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')和Geo11 (5'-ACC TTG TTA CTT TTA CTT CC-3')。将得到的PCR产物送到北京华大基因测序部,根据测序的结果,在BLAST系统中找出对应菌种。

[0052] 将分离出的菌种通过对其菌落形态观察,结合分子鉴定结果(PCR序列相似度)比较,鉴定出分别为:蜡样芽孢杆菌、粘红酵母和赖氨酸芽孢杆菌。

[0053] 表1 强化耐旱微生物鉴定结果

菌株 <sup>①</sup>	PCR 序列相似 度 <sup>②</sup>	鉴定结果 <sup>③</sup>	中文名称 <sup>④</sup>
[0054] 优势细菌 I <sup>⑤</sup>	99% <sup>⑥</sup>	<i>Bacillus cereus</i> <sup>⑦</sup>	蜡样芽孢杆菌 <sup>⑧</sup>
优势细菌 II <sup>⑤</sup>	99% <sup>⑥</sup>	<i>Lysinibacillus</i> <sup>⑦</sup>	赖氨酸芽孢杆菌 <sup>⑧</sup>
优势真菌 I <sup>⑤</sup>	98% <sup>⑥</sup>	<i>Rhodotorula glutinis</i> <sup>⑦</sup>	粘红酵母 <sup>⑧</sup>

[0055] 1.3.5复合微生物菌剂制备

[0056] 将筛选得到的三种强化耐旱微生物在相应的液体培养基中扩大培养。蜡样芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养,粘红酵母在28℃,220r/min培养。培养后蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母按1:1:1的体积比例配制成复合微生物菌液,稀释100倍备用。

[0057] 1.4实验设计

[0058] 本实验设两个干旱胁迫处理水平:中度干旱胁迫:60%~40% FC(Field Capacity,田间持水量),重度干旱胁迫:40%~20% FC,每个胁迫设3个处理,4次重复,两个胁迫所设处理相同,分别为:

[0059] (1)以100%土壤为对照基质并加入15 ml空白培养基(CK)

[0060] (2)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml空白培养基(M1)

[0061] (3)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml强化耐旱微生物菌剂(M2)



## [0062] 1.5草皮建植

[0063] 以灭菌后的土壤为基质进行草坪植物栽培试验,纳米堆肥采用混施的方式施入土壤基质,实验时基质用量为 $9400\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ,草皮基质厚度为15 mm,高羊茅草种播种量为 $160\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。将种子浸泡24h后均匀播洒于基质表层,首先进行黑暗处理,萌发后植株生长初期,每天统一定量给水,以保持培养基质水分状况良好。生长第10d时分别浇入15ml灭菌后的空白培养基和强化耐旱微生物菌剂。生长15d后进行干旱胁迫,按照胁迫程度进行称重浇水,以维持在胁迫范围内,干旱胁迫持续25d后取样,进行生理生态指标测定。实验期间光照强度为 $400\text{--}600\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,室内的相对湿度为50–55%,温度为20–23℃,

## [0064] 1.6指标的测定

## [0065] 1.6.1生物量的测定

[0066] 最后将草坪植物齐基质刈割,测量地上鲜重,根部用蒸馏水冲洗干净,置于烘箱中105℃条件下杀青30 min,80℃ 烘干至恒重,测量地上和地下干重。

## [0067] 1.6.2叶绿素含量的测定

[0068] 叶绿素含量的测定:取0.1 g叶片,剪成1–2 mm碎片,浸泡于丙酮:乙醇(V:V=1:1)溶液中24小时,浸泡液为待测液。用分光光度计于波长633 nm和645 nm下测量吸光值,并根据公式计算叶绿素含量。

## [0069] 结果计算:

$$\begin{aligned}\text{叶绿素a}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) &= (12.71A_{663} - 2.59A_{645}) \cdot \frac{V}{1000W} \\ \text{叶绿素b}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) &= (22.88A_{645} - 4.67A_{663}) \cdot \frac{V}{1000W} \\ \text{叶绿素总含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) &= (8.04A_{663} + 20.29A_{645}) \cdot \frac{V}{1000W}\end{aligned}$$

[0070] 其中,  $A_{663}$ 、 $A_{645}$ 分别为叶绿素提取液在663nm和645nm处的吸光度

$V$ —叶绿素提取液体积 (mL)

$W$ —材料重 (g)

## [0071] 1.6.4节水率的测定

[0072] 记录各处理每天的给水量,计算实验期间各处理给水总量。按下式计算节水率:

[0073] 节水率(%) = (对照组总给水量—处理组总给水量) / 对照组总给水量 × 100%

## [0074] 1.7数据分析

[0075] 采用Microsoft Excel和SPSS 17.0软件进行处理。

## [0076] 2研制结果分析

## [0077] 2.1强化微生物联合纳米堆肥对干旱胁迫下高羊茅生物量及根冠比的影响

[0078] 不同胁迫程度下,强化微生物联合纳米堆肥处理,均能显著促进高羊茅地上地下的生长,提高植株的根冠比(表2),增强高羊茅在逆境下的适应能力。表现在,中度干旱胁迫时,高羊茅地上地下生物量与对照相比存在显著差异,分别是对照组生物量的3.6倍和4.3倍,根冠比也比对照高出18.0%( $p < 0.05$ ),在重度干旱胁迫时,强化微生物联合纳米堆肥处理组的地上地下生物量及根冠比,分别比对照高出68.6%、122.5%和32.0%( $p < 0.05$ )。纳米堆肥处理组对高羊茅的生长也具有明显的促进作用,中度和重度胁迫时的地下干重,分别比对照高出159.5%和89.4%。强化纳米微肥处理组与强化微生物联合纳米堆肥处理组的地下

干重之间,在两种胁迫程度下均存在显著性差异,说明驯化后的微生物菌剂,有利于植物根系的生长,促进植株对营养元素的吸收。

[0079] 表2强化纳米微肥对于干旱胁迫下草坪植物生物量的影响

胁迫程度 <sup>a</sup>	处理 <sup>b</sup>	地上干重(g m <sup>-2</sup> ) <sup>c</sup>	地下干重(g m <sup>-2</sup> ) <sup>c</sup>	根冠比 <sup>d</sup>
中度 <sup>e</sup>	CK <sup>e</sup>	17.3±0.1c <sup>e</sup>	28.9±1.7c <sup>e</sup>	1.68±0.01c <sup>e</sup>
	M1 <sup>e</sup>	39.9±3.0b <sup>e</sup>	75.1±4.4b <sup>e</sup>	1.88±0.02b <sup>e</sup>
	M2 <sup>e</sup>	62.3±0.9a <sup>e</sup>	123.1±1.8a <sup>e</sup>	1.98±0.03a <sup>e</sup>
重度 <sup>e</sup>	CK <sup>e</sup>	18.5±0.3b <sup>e</sup>	16.0±0.2c <sup>e</sup>	1.53±0.03c <sup>e</sup>
	M1 <sup>e</sup>	16.7±0.3a <sup>e</sup>	30.3±0.5b <sup>e</sup>	1.80±0.02b <sup>e</sup>
	M2 <sup>e</sup>	17.7±0.2a <sup>e</sup>	33.6±0.8a <sup>e</sup>	2.02±0.03a <sup>e</sup>

[0081] 注: 同胁迫程度不同处理数据中不同小写字母表示差异显著(P<0.05); 下同。

[0082] 2.2强化微生物联合纳米堆肥对于干旱胁迫下高羊茅叶绿素的影响

[0083] 由表3可知,两种胁迫程度下,强化微生物联合纳米堆肥处理与单施纳米堆肥处理的叶绿素a和总叶绿素,均显著高于对照处理组。中度干旱胁迫时,M2处理叶绿素a和总叶绿素含量,与对照相比,分别高出对照49.9%和30.45%(p<0.05)。重度干旱胁迫时,M2处理叶绿素a和总叶绿素含量,分别比对照高出44.2%和45.5%,叶绿素b也有不同程度的增加。M1处理叶绿素a和总叶绿素含量略低于M2处理,但与对照相比增加显著。重度干旱胁迫时,M1处理叶绿素a和总叶绿素含量,与对照相比,分别高出23.0%和29.4%。

[0084] 表3强化微生物菌剂联合纳米堆肥对不同干旱胁迫下高羊茅叶绿素的影响(mg·g<sup>-1</sup>FW)

胁迫程度 <sup>a</sup>	处理 <sup>b</sup>	叶绿素 a <sup>c</sup>	叶绿素 b <sup>c</sup>	总叶绿素 <sup>d</sup>
中度 <sup>e</sup>	CK <sup>e</sup>	1.353±0.012c <sup>e</sup>	0.763±0.016a <sup>e</sup>	2.115±0.016c <sup>e</sup>
	M1 <sup>e</sup>	1.741±0.005b <sup>e</sup>	0.733±0.009a <sup>e</sup>	2.494±0.008b <sup>e</sup>
	M2 <sup>e</sup>	2.028±0.019a <sup>e</sup>	0.732±0.023a <sup>e</sup>	2.759±0.019a <sup>e</sup>
重度 <sup>e</sup>	CK <sup>e</sup>	1.074±0.008c <sup>e</sup>	0.401±0.018b <sup>e</sup>	1.475±0.019c <sup>e</sup>
	M1 <sup>e</sup>	1.321±0.007b <sup>e</sup>	0.587±0.014a <sup>e</sup>	1.908±0.008b <sup>e</sup>
	M2 <sup>e</sup>	1.549±0.008a <sup>e</sup>	0.597±0.014a <sup>e</sup>	2.146±0.006a <sup>e</sup>

[0086] 2.3强化微生物联合纳米堆肥对于干旱胁迫下高羊茅节水率的影响

[0087] 由表4可知,中度胁迫下,强化微生物联合纳米堆肥处理组,平均每天给水量和用水总量都均明显降低(p<0.05)。单施纳米堆肥处理组,在重度干旱胁迫时用水量与对照相比差异显著。强化微生物联合纳米堆肥处理能显著提高高羊茅对水分的利用效率,在中度胁迫和重度胁迫时,节水率分别为43.10%和52.39%。

[0088] 表4强化微生物联合纳米堆肥对于干旱胁迫下高羊茅节水率的影响

胁迫程度	处理	平均每天给水量 (mL)	给水总量 (mL)	节水率 (%)
中度	CK	12.13±0.009a	424.46±0.30a	
	M1	8.31±0.056b	297.85±1.95b	29.83%
	M2	6.90±0.038c	241.50±1.33c	43.10%
重度	CK	9.47±0.039a	331.36±1.37a	
	M1	6.05±0.019b	211.26±0.68b	36.24%
	M2	4.51±0.034c	157.76±1.18c	52.39%

### [0090] 3结论

[0091] 研究表明,在干旱胁迫下,纳米堆肥联合微生物有助于高羊茅的生长,提高叶片保护酶活性,增强植株对干旱胁迫的适应能力,中度胁迫和重度胁迫时,节水率分别为43.10%和52.39%。这是由于一方面,干旱胁迫下,施入强化纳米微肥后,由于纳米材料的小尺寸效应,使其表面原子周围有许多悬空键,这使得纳米结构肥料表面能、表面结合能增大,有利于其在土壤中被植物根系吸收,利用率得到提高。另一方面,强化微生物复合菌及的施入保持了土壤干旱胁迫下的微生物活性,微生物刺激植株根系的生长,促进营养物质和水分的吸收利用。

### 具体实施方式

[0092] 为了更充分的解释本发明的实施,提供下述制备方法实施实例。这些实施实例仅仅是解释、而不是限制本发明的范围。需要特别说明是:本发明筛选得到的复合微生物菌剂中蜡样芽孢杆菌、粘红酵母和赖氨酸芽孢杆菌市场上均有销售,也可以采用本发明的方法从生活垃圾堆肥中分离得到复合微生物菌剂,其得到的菌群的生化特性与市售的相同故未在保藏。

#### [0093] 实施例1

[0094] 一种采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法,其特征在于按如下的步骤进行:

[0095] (1) 纳米堆肥的制备:将生活垃圾堆肥105℃烘干至恒重,将垃圾堆肥加工研磨制成30-35nm纳米堆肥,备用;

[0096] (2) 耐旱微生物菌剂的制备

[0097] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;

[0098] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物耐低温强化是将不同浓度梯度(10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>和10<sup>-6</sup>)涂布在相应的培养基上(即牛肉膏蛋白胨培养基,高氏I号培养基和马丁氏培养基)放置在人工气候培养箱中培养2周,温度为10℃;

[0099] 混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法。未经过强化的混合菌群一般在无PEG6000的条件下生长较好,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;即在本实验中PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群,含有蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母;

[0100] (3)复合耐旱微生物菌剂的配制

[0101] 将筛选得到的三种强化耐旱微生物在相应的液体培养基中扩大培养,蜡样芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养,粘红酵母在28℃,220r/min培养,培养后蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母按体积比1:1:1的配制成复合微生物菌液,稀释100倍备用;

[0102] (4)草皮基质组配与强化微生物联合纳米堆肥应用

[0103] 中度干旱胁迫:60%~40%,重度干旱胁迫:40%~20%,每个胁迫设3个处理,4次重复,两个胁迫所设处理相同,分别为:

[0104] 1)以100%土壤为对照基质并加入15 ml空白培养基

[0105] 2)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml空白培养基

[0106] 3)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml强化耐旱微生物菌剂

[0107] (5)以灭菌后的土壤为基质进行草坪植物栽培试验,纳米堆肥采用混施的方式施入土壤基质,实验时基质用量为9400g<sup>m</sup><sup>-2</sup>,草皮基质厚度为15 mm,高羊茅草种播种量为160g<sup>m</sup><sup>-2</sup>,将种子浸泡24h后均匀播洒于基质表层,首先进行黑暗处理,萌发后植株生长初期,每天统一定量给水,以保持培养基质水分状况良好,生长第10d时分别浇入15ml灭菌后的空白培养基和强化耐旱微生物菌剂,生长15d后进行干旱胁迫,按照胁迫程度进行称重浇水,以维持在胁迫范围内,干旱胁迫持续25d后取样,进行生理生态指标测定,实验期间光照强度为400μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,室内的相对湿度为50%,温度为20℃,最后将草坪植物齐基质刈割,测量地上鲜重,根部用蒸馏水冲洗干净,置于烘箱中105℃条件下杀青30 min,80℃烘干至恒重,测量地上和地下干重。其中:PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群。其中:选取籽粒饱满、大小均匀的多年生高羊茅(*Festuca arundinacea* L.)种子为试验材料;

[0108] 生活垃圾堆肥来自天津市小淀堆肥厂,基本理化性质为:pH 7.62,饱和含水量0.76 ml/g,容重0.85 g/ml,全氮5.18%,全钾50.83 g/kg,有效磷77.92 mg/kg,有机质12.12%,将垃圾堆肥去除其中的木头、塑料、金属等杂物,风干后备用;

[0109] 土壤基质剔除杂物,过2mm筛,放置于通风口处2-3d,自然条件下风干,其理化性质为:pH 7.44,饱和含水量0.58mL /g,有机质4.68%,全氮0.21%,有效磷22.03 mg /kg,全钾45.61g /kg。

[0110] 实施例2

[0111] 采用耐旱强化活性纳米垃圾堆肥提高草坪草抗旱性的方法:

[0112] (1)纳米堆肥的制备:将生活垃圾堆肥105℃烘干至恒重,将垃圾堆肥加工研磨制成30-35nm纳米堆肥,备用;

[0113] (2)耐旱微生物菌剂的制备

[0114] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;

[0115] 将堆肥样品称取10g置于无菌锥形瓶中,加入100mL无菌水振荡均匀后,取10mL悬浮液于盛有100mL富集培养基的锥形瓶中,在28℃,220r/min下振荡培养3d,即为混合微生物菌群;混合微生物耐低温强化是将不同浓度梯度( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ )涂布在相应的培养基上(即牛肉膏蛋白胨培养基,高氏I号培养基和马丁氏培养基)放置在人工气候培养箱中培养2周,温度为10℃;

[0116] 混合微生物菌群耐旱强化采用的是逐步增加PEG6000浓度的方法。未经过强化的混合菌群一般在无PEG6000的条件下生长较好,在强化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高PEG6000浓度,PEG6000的浓度以5%的梯度增加,最终目标是25%;即在本实验中PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群,含有蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母;

[0117] (3)复合耐旱微生物菌剂的配制

[0118] 将筛选得到的三种强化耐旱微生物在相应的液体培养基中扩大培养,蜡样芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养,粘红酵母在28℃,220r/min培养,培养后蜡样芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和粘红酵母按体积比1:1:1的配制成复合微生物菌液,稀释100倍备用;

[0119] (4)草皮基质组配与强化微生物联合纳米堆肥应用

[0120] 中度干旱胁迫:60%~40%,重度干旱胁迫:40%~20%,每个胁迫设3个处理,4次重复,两个胁迫所设处理相同,分别为:

[0121] 1)以100%土壤为对照基质并加入15 ml空白培养基

[0122] 2)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml空白培养基

[0123] 3)土壤和纳米堆肥按59:1的比例混合并加入15ml强化耐旱微生物菌剂

[0124] (5)以灭菌后的土壤为基质进行草坪植物栽培试验,纳米堆肥采用混施的方式施入土壤基质,实验时基质用量为9400g $m^{-2}$ ,草皮基质厚度为15 mm,高羊茅草种播种量为160g $m^{-2}$ ,将种子浸泡24h后均匀播洒于基质表层,首先进行黑暗处理,萌发后植株生长初期,每天统一定量给水,以保持培养基质水分状况良好,生长第10d时分别浇入15ml灭菌后的空白培养基和强化耐旱微生物菌剂,生长15d后进行干旱胁迫,按照胁迫程度进行称重浇水,以维持在胁迫范围内,干旱胁迫持续25d后取样,进行生理生态指标测定,实验期间光照强度为600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,室内的相对湿度为55%,温度为23℃,最后将草坪植物齐基质刈割,测量地上鲜重,根部用蒸馏水冲洗干净,置于烘箱中105℃条件下杀青30 min,80℃烘干至恒重,测量地上和地下干重。其中:PEG6000的浓度分别为5%、10%、15%、20%和25%。每增加一次PEG6000的浓度,要待菌体增长量稳定后,才能继续增加PEG6000的浓度,逐级强化出耐旱混合微生物菌群。其中:选取籽粒饱满、大小均匀的多年生高羊茅(*Festuca arundinacea* L.)种子为试验材料;

[0125] 生活垃圾堆肥来自天津市小淀堆肥厂,基本理化性质为:pH 7.62,饱和含水量 0.76 ml/g,容重0.85 g/ml,全氮5.18%,全钾50.83 g/kg,有效磷77.92 mg/kg,有机质 12.12%,将垃圾堆肥去除其中的木头、塑料、金属等杂物,风干后备用;

[0126] 土壤基质剔除杂物,过2mm筛,放置于通风口处2-3d,自然条件下风干,其理化性质为:pH 7.44,饱和含水量0.58mL /g,有机质4.68%,全氮0.21%,有效磷22.03 mg /kg,全钾 45.61g /kg。