



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105624076 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201610215615. 5

C12R 1/885(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 04. 08

C09K 101/00(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C09K 109/00(2006. 01)

CGMCC No. 11624 2015. 11. 06

(71) 申请人 山东康地得生物开发有限公司

地址 256414 山东省淄博市桓台县果里镇义和路 20 号

(72) 发明人 梁涛 张海立 王明英

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公司 37205

代理人 曲志波

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 1/14(2006. 01)

C09K 17/14(2006. 01)

C12R 1/125(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

(54) 发明名称

耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌及复合微生物菌剂和制备方法

(57) 摘要

一种耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌及复合微生物菌剂和制备方法,该菌株针对北方温室大棚硝酸盐积累产生的高酸度和盐渍化环境,通过紫外诱变选育的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌具有高效去除北方温室大棚土壤硝酸氮的作用。本发明还公开了一种复合微生物菌剂及制备方法。以保藏号为 CGMCC No. 11624 的枯草芽孢杆菌为主要菌种,辅以放线菌、绿色木霉制成的复合微生物菌剂在北方温室大棚土壤中活性更高,对大棚的土壤的盐渍化、酸化具有良好修复效果,极大提高了大棚土壤的生物活性。

1. 一种耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌,其特征是已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏时间为2015年11月6日,保藏号为CGMCC No.11624,生物学分类命名为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2. 一种复合微生物菌剂,其特征是它包括如下组分且组分之间的体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1。

3. 一种复合微生物菌剂的制备方法,其特征是它包括如下步骤:

(1)保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌以摇瓶培养、种子罐发酵和发酵罐发酵获得活菌菌数为 1×10^9 个/ml的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3菌液;

(2)放线菌和绿色木霉采用市售菌株,分别发酵扩培,分别获得放线菌菌液和绿色木霉菌液;放线菌菌液和木霉菌菌液中活菌菌数分别为 1×10^9 个/ml;

(3)组分之间的体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1;按上述体积比将三者混匀,即得到本发明所述的复合微生物菌剂。

耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌及复合微生物菌剂和制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌及复合微生物菌剂。

背景技术

[0002] 近20年在北方地区温室大棚蔬菜得到迅猛的发展,但是在生产过程中多数菜农忽视了温室大棚内土壤的管理。在追求温室大棚蔬菜优质、高产、高效的目标下,努力提高复种指数,盲目增加施肥数量和次数。例如在山东寿光蔬菜温室大棚在栽培过程中生鲜畜禽粪便施用量一般在 $90-150\text{m}^3/\text{hm}^2$,最高超过 $200\text{m}^3/\text{hm}^2$;化肥投入量一般在 $7500\text{kg}/\text{hm}^2$ 左右,远远超出蔬菜的吸收量。大量的含氮化肥和有机肥料分解产物在好氧条件下经硝化作用转化为硝态氮积累在土壤中,导致大棚土壤中硝态氮含量急剧上升。同时由于温室大棚中缺少雨淋,表层积盐不能淋洗到土壤深层,加上温室大棚中温度高,土壤中的盐分随着水的蒸腾作用向土壤的表层聚集。在温室栽培条件下,土壤盐渍化的主要特点之一是硝酸盐积累。研究表明温室表层土壤中的硝酸根约占阴离子总量的67—76%,最高达到 $0.66\text{g}/\text{kg}$

硝酸根离子的大量积累不仅造成温室大棚土壤的盐渍化,而且 NO_3^- 强酸性阴离子在全盐含量中所占比例大幅上升导致温室大棚的土壤pH值下降。随着温室大棚种植年限的增加,土壤的pH也不断降低。北方一些蔬菜大棚土壤pH值由原来的7-8降低到4-5,导致大棚土壤的理化性质和生物活性恶化,病虫害严重发生,蔬菜品质和产量显著下降。

[0003] 目前针对我国设施栽培大棚土壤盐渍化和酸化的情况,采取了一些治理措施,如灌水洗盐,土壤改良剂法等方法。虽然这些方法有不少优点,但也存在很大的不足:灌水洗盐会把硝态氮淋洗到地下,污染地下水;土壤改良剂法成本比较高,且多利用化工原料或工业废弃物作为原料,也产生了土壤复酸化、重金属污染等问题。

[0004] 对现有技术的检索发现申请号为201510471378.4的中国发明专利申请公开了“一种能改良酸化土壤的肥料添加剂”。其主要成分主要包括:蒙脱石粉、泥炭土、淤泥、落叶碎末、石榴皮、双氰胺、硫脲、活性炭、果渣、贝壳粉、硅钙粉、木质素、EM菌剂、枯草芽孢杆菌菌剂、复配除臭剂。可将甘蔗种植地土壤PH由4.6提高到5.7。但其使用的EM菌、枯草芽孢杆菌并未经过针对大棚酸性土壤特别筛选,其对土壤中硝酸盐氮的反硝化或分解效果不明。该发明改善土壤pH的有效成分主要是蒙脱石粉这一天然矿物,通过水解产生的氢氧根离子中和土壤中的酸根离子。随着氢氧根离子的消耗,其改善土壤pH的效果并不持久。而且现有技术不适合用于设施大棚土壤的改良,在于蒙脱石粉水解产生的Al、Mg阳离子又会加重土壤的积盐的程度。

[0005] 申请号为201310512371.3的中国发明专利申请公开了一种“硝酸盐同化细菌及其在修复设施次生盐渍化土壤中的应用”。通过硝酸盐同化细菌巨大芽孢杆菌NCT-2以土壤中硝态氮作为氮源,并将其同化为其它形态的无机氮或细胞组分,从而实现硝态氮的降解转化、降低土壤中硝态氮含量并对土壤进行修复。NCT-2要针对轻度盐渍化土壤,其在 $100\text{mg}/\text{kg}$ 土壤中硝态氮转化率可达98.4%,但在 $200\text{mg}/\text{kg}$ 土壤中硝态氮转化率仅为45.5%。

[0006] 现有技术提供的反硝化枯草芽孢杆菌制剂主要针对水体的硝酸盐除氮,水体一般

接近中性或微碱环境。例如CN02147874.0公开了一株好氧反硝化枯草芽孢杆菌制剂的制备方法。其对虾塘水体中的亚硝酸盐进行反硝化去除,该枯草芽孢杆菌菌株的培养及应用pH为7.0-9.0之间。又如CN201510405040.9公开了一种好氧反硝化枯草芽孢杆菌制剂的制备方法用于去除虾塘水体中亚硝酸盐。其菌株的培养和应用pH为7.0-8.0。我们知道强酸会造成碱性蛋白质的功能团被中和并被降解,使蛋白质变性。因此没有针对低pH条件进行优化筛选的菌株,在低pH环境中活性会明显降低甚至死亡。这些好氧反硝化枯草芽孢杆菌菌株并不能适应北方温室大棚土壤的低pH环境(pH低至4.0)。经试验对比,市售用于水体的反硝化枯草芽孢杆菌制备的复合微生物菌剂在温室大棚土壤中的反硝化氮去除率只有53%,远低于本发明提供的复合微生物菌剂硝酸盐氮去除率98%。

发明内容

[0007] 本发明针对北方温室大棚硝酸盐积累产生的高酸度和盐渍化环境,通过紫外诱变选育的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌具有高效去除北方温室大棚土壤中的硝酸根的能力。

[0008] 为实现上述目的,本发明公开了一种耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌,所述菌株生物学分类命名为枯草芽孢杆菌,拉丁文名称为*Bacillus subtilis*,鉴定参据编号KD203-3,所述菌株已于2015年11月6日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,邮编100101,保藏编号为CGMCC No.11624。

[0009] 保藏编号为CGMCC No.11624的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌通过下述步骤从土壤中筛选、诱变选育而得:

1. 反硝化出发菌株的分离纯化

通过系列稀释平板法以pH4.0的牛肉膏蛋白胨硝酸盐固体培养基从临淄10年棚龄的酸化和盐渍化土壤中挑选单菌落。用pH4.0的硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基培养单菌落,分别使用格里斯(Griess)试剂和二苯胺试剂检测硝酸盐葡萄糖培养基中硝态氮还原情况,在反硝化能力强的菌株培养液中再检测硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的浓度,最终筛选出耐酸反硝化能力强的野生型出发菌株KD203。

[0010] 所述的牛肉膏蛋白胨硝酸盐培养基为:5g牛肉浸膏、10g蛋白胨、5g氯化钠、1g硝酸钾、20g琼脂,1000mL蒸馏水。

[0011] 所述的硝酸盐葡萄糖反硝化培养基为:5g葡萄糖、2g硝酸钾、1gKH₂PO₄、1gK₂HPO₄、0.20gMgSO₄·7H₂O、1000mL蒸馏水。

2. 野生型出发菌株的诱变筛选

将野生型出发菌株KD203接种到pH4.0的牛肉膏蛋白胨硝酸盐液体培养基,30℃条件下,转速120rpm,培养24h,获得菌浓度在10¹⁰个/ml以上的菌液。取菌液50ml,离心,收集菌体。在菌体中加入无菌水制备等体积菌悬液,分装成5个平皿,用紫外线照射各皿。紫外灯功率20w,平皿离紫外灯距离20cm,照射时间为60s。将处理液稀释至每毫升含10²-10⁴个菌数,每个稀释度取0.1ml涂平板,30℃恒温培养24h。挑选突变单菌落,分别检测突变菌株在pH4.0条件下的反硝化能力,经筛选获得诱变菌株KD203-3,即得到保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌。该诱变菌株KD203-3能在30℃,转速120rpm条件下,培养4d,对pH4.0的硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基中硝酸盐氮的去除率达到88%。

[0013] 对本发明的枯草芽孢杆菌KD203-3在形态、16S rDNA 基因序列和生理生化方面进行鉴定。

[0014] 试验1:对耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3的形态进行鉴定。

[0015] 将枯草芽孢杆菌KD203-3接种于LB培养基上,培养24小时后的培养性状为:枯草芽孢杆菌KD203-3产生芽孢,芽孢大多数为近端生、少数为中生,孢子囊膨大不明显;LB(细菌基础培养基)培养基平皿上菌落呈不规则圆形状、表面不平整、乳白色、膜质,不透明、表面暗色。

[0016] 经革兰氏染色,枯草芽孢杆菌KD203-3的形态为:革兰氏阳性,杆状、两端钝圆,少数呈不同程度链状排列。

[0017] 实验2:对枯草芽孢杆菌KD203-3的16S rDNA基因序列进行鉴定。采用天根生化科技(北京)有限公司基因组DNA提取试剂盒提取该菌株的基因组DNA,然后以提取的总DNA作为模板。扩增引物为通用引物,将PCR(聚合酶链反应)产物送宝瑞通生物技术(北京)有限公司测序分析。将测序结果进行同源性比较,比较结果表明,枯草芽孢杆菌KD203-3的菌株属于枯草芽孢杆菌。

[0018] 本发明还提供了一种复合微生物菌剂,其特征是它包括如下组分且组分之间的体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌:和绿色木霉=6:3:1。

[0019] 一种复合微生物菌剂的制备方法,其特征是它包括如下步骤:

(1)保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌以摇瓶培养、种子罐发酵和发酵罐发酵获得活菌菌数为 1×10^9 个/ml的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3菌液。

[0020] (2)放线菌和绿色木霉采用市售菌株,分别发酵扩培,分别获得放线菌菌液和绿色木霉菌液。放线菌菌液和木霉菌菌液中活菌菌数分别为 1×10^9 个/ml。

[0021] (3)组分之间的体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1。按上述体积比将三者混匀,即得到本发明所述的复合微生物菌剂。

[0022] 本发明的有益效果是:本发明通过紫外诱变筛选出针对北方冬暖大棚氮肥施用量过多导致硝酸盐积累产生的土壤盐渍化和酸化的高效耐酸反硝化的保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌,对含量达500mg/kg土壤中硝酸盐氮去除率达到90%以上。由耐酸反硝化的保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌为主成分,配以放线菌、绿色木霉制备的复合微生物菌剂,在北方温室大棚土壤中存活率和生物活性更高,对土壤的积盐量、理化性质、生物活性都有极大的改善。本发明提供的微生物菌剂通过优化微生物菌种的配比,以耐酸反硝化枯草芽孢杆菌对温室大棚酸化、盐渍化土壤的极强的适应能力和生物活性,可以高效的去除温室大棚土壤的硝酸根积累,改善土壤微环境下的pH值和积盐含量,可以提高配伍菌种——放线菌和绿色木霉在温室大棚土壤中的存活率和生物活性,增加土壤中的微生物的生物活性和生物酶活性,提高土壤生物肥力。

[0023] 针对设施大棚土壤酸化和盐渍化伴生的形成原因,特别选育的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD-203可同时适应土壤的高盐高酸度环境,活性高。能够长效改善土壤pH和盐渍化。施用本发明的微生物菌剂可以使土壤pH提高到更加适宜作物生长的pH条件,使硝酸盐氮含量降低65.01%,使大棚土壤更加适合农作物的生长。由于耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌对土壤微环境下理化性质的改良(pH和高盐环境),提高了施用微生物菌剂中微生物的存活率和生物活性。故施用本发明微生物菌剂可使土壤中细菌、真菌、放线菌的数量分别提高

142.8%、77.6%、117.7%，同时使土壤中脲酶、磷酸酶、蔗糖酶活性分别提高了76.9%、52.7%、50.8%，极大地提高了土壤生物活性，对大棚土壤的改良有极大的改良效果。由此可见，以选育的耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌为主成分，辅以放线菌、绿色木霉制成的复合微生物菌剂在北方温室大棚土壤中活性更高，对温室大棚盐渍化、酸化土壤具有良好修复效果，明显改善大棚土壤的生物活性和理化性质。

具体实施方式

[0024] 实施例1：所述耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌菌株KD203-3通过下述步骤从土壤中筛选、诱变选育而得：

1. 反硝化出发菌株的分离纯化

选定淄博市临淄区种植10年温室大棚，取深层(5-15cm)土壤约300g。称取10g刚采集的新鲜土壤放入装有90mL无菌水的锥形瓶(装有若干玻璃珠)中，制成稀释度为 10^{-1} 的土壤悬液。另取7支装有9mL无菌水的试管取无菌移液管，依次制成稀释度为 $10^{-4} \rightarrow 10^{-5} \rightarrow 10^{-6} \rightarrow 10^{-7} \rightarrow 10^{-8}$ 土壤稀释液。

[0025] 配置pH4.0的牛肉膏蛋白胨硝酸盐固体培养基，于 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 、20min灭菌后无菌条件下倒入灭过菌的培养皿，制备成平板备用。牛肉膏蛋白胨硝酸盐培养基为：5g牛肉浸膏、10g蛋白胨、5g氯化钠、1g硝酸钾、20g琼脂，1000mL蒸馏水。

[0026] 以无菌移液管加入0.1mL制好的土壤稀释液(稀释度分别为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})，用无菌玻璃刮刀将土壤稀释液在平板表面涂抹均匀；将平板倒置于 30°C 恒温生化培养箱中培养2-3天。

[0027] 用灭过菌的接种环从平板上挑选单菌落接种于装有5mL、pH4.0的硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基的试管中，置于 30°C 、100r/min下恒温振荡培养3天。硝酸盐葡萄糖反硝化培养基为：葡萄糖5g，硝酸钾2g，磷酸二氢钾1g，磷酸一氢钾1g，七水硫酸镁0.20g，蒸馏水1000mL。

[0028] 培养结束后，在各试管中滴加1-2滴格里斯(Griess)试剂以检测是否有亚硝酸盐的存在，若培养液马上呈粉红色或棕色，说明硝酸盐被还原成亚硝酸盐，该溶液中存在具有好氧反硝化作用的细菌。若无粉红色或棕色出现，则进一步滴加二苯胺试剂，培养液若呈蓝色，则表示培养液中硝酸盐未被转化，溶液中无具有反硝化作用的细菌。若无色，则表示硝酸盐和新形成的亚硝酸盐都已还原成氨氮氧化物或氮气，该培养液中存在具有较强好氧反硝化作用的细菌。

[0029] 在上述试管中鉴别出具有好氧反硝化作用的细菌后，将试管中菌液接种到pH4.0硝酸盐葡萄糖反硝化平板表面涂布均匀， 30°C 恒温生化培养箱中培养2-3d后分离单菌落，于pH4.0硝酸盐葡萄糖培养基斜面留存备用。

[0030] 用灭过菌的接种环分别从筛选出的具备一定反硝化能力的单菌落斜面上取一环菌种回接到装有100mL灭过菌的pH4.0硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基的250mL锥形瓶中，置于 30°C 、100r/min下恒温振荡培养4d。测定培养液中硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的浓度，最终筛选出耐酸反硝化能力强的野生型出发菌株KD203。

[0031] 2. 野生型出发菌株KD203的诱变筛选

将野生型出发菌株KD203接种到装有100mL灭过菌的pH4.0牛肉膏蛋白胨硝酸盐液体培

培养基的250mL锥形瓶中,于30℃、120r/min下恒温培养24h,获得菌浓度在 10^9 个/ml以上的菌液。

[0032] 取菌浓度在 10^9 个/ml以上的菌液50ml,离心,收集菌体。用无菌水制备等体积菌悬液,分装成5个平皿,用紫外线照射各皿。紫外灯功率20w,平皿离紫外灯距离20cm,照射时间为60s。将处理液稀释至每毫升含 10^2 - 10^4 个菌数,每个稀释度取0.1ml涂平板,30℃恒温培养2-3d。挑选突变单菌落,分别接到装有100mL灭过菌的pH4.0硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基的250mL锥形瓶中,置于30℃、100r/min下恒温振荡培养2d。测定培养液中硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的浓度,分别检测突变菌株在pH4.0条件下的反硝化能力,筛选获得pH4.0条件下反硝化能力最强的诱变菌株耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3。

[0033] 实施例2:耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3反硝化能力检测

为检测耐酸反硝化枯草芽孢杆菌KD203-3在不同pH条件下的反硝化能力,挑选耐酸反硝化枯草芽孢杆菌KD203-3菌株单菌落一环,分别接到装有100mL灭过菌的pH4.0—7.5五个pH梯度的硝酸盐葡萄糖反硝化液体培养基的250mL锥形瓶中,置于30℃、120r/min下恒温振荡培养4d。

[0034] 实验表明,经紫外诱变的耐酸反硝化枯草芽孢杆菌菌株KD203-3在硝酸态氮含量277mg/L pH4.0-7.5条件下,除氮率最低为88.35%,最高为100%。具体结果如表1示:

表1:

KD203-3 在不同 pH 条件反硝化能力检测					
序号	pH 值	NO ₃ ⁻ -N 初始浓度 (mg/L)	总氮 结束浓度 (mg/L)	总氮 去除量 (mg/L)	去除率
1	4.0	277	25.3	251.7	90.87
2	4.5	277	32.3	244.7	88.34
3	5.5	277	10.8	266.2	96.10
4	6.5	277	6.8	270.2	97.55
5	7.5	277	0	277	100

实施例3:本发明提供了一种复合微生物菌剂,以耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3为主成分,辅以放线菌、绿色木霉制成。选取连续种植番茄的十年大棚,布置正交试验,每个处理重复3次,30天后取土表层20cm进行混匀,土样进行预处理后测定PH、硝酸盐氮含量、土壤生物量和酶活指标测定。CK为空白对照。

[0035] 试验结果表明,组分之间的最佳体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌和绿色木霉=6:3:1。按上述体积比将三者混匀,即得到本发明所述的复合微生物菌剂,土壤PH提高到6.16,硝酸盐氮的去除率达到最高的91.91%,土壤的生物量和酶活与

对照相比分别提高177%和111%，显著提高了土壤的生物活性。

[0036] 表3 本发明配比的正交试验方案

处理 \ 因素	KD203-3 (*10 ⁵ 个/g)	放线菌 (*10 ⁵ 个/g)	木霉菌 (*10 ⁵ 个/g)
1	5	2	3
2	5	3	2
3	5	4	1
4	6	2	2
5	6	3	1
6	6	4	3
7	7	2	2
8	7	3	3
9	7	4	1

表4 正交试验结果分析

处理	pH	硝酸盐氮含量 (mg/kg)	硝酸盐氮去除率 (%)	生物量 (10^7 cfu/g)	酶活 (mg/g)
=CK	4.24	470	-	1.35	0.36
1	4.86	266	43.40	2.57	0.56
2	4.90	282	40.00	2.36	0.54
3	4.90	284	39.57	2.07	0.47
4	5.78	109	76.81	2.89	0.64
5	6.16	38	91.91	3.74	0.76
6	5.74	120	74.47	2.85	0.64
7	5.12	166	64.68	3.01	0.61
8	5.20	182	61.28	2.95	0.57
9	5.16	184	60.85	2.64	0.60

实施例4:复合微生物菌剂制备方法

步骤一:耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌KD203-3以摇瓶培养、种子罐发酵和发酵罐发酵获得活菌数为 1×10^9 个/ml的枯草芽孢杆菌KD203-3菌液。

[0037] 摇瓶培养使用LB液体培养基,配方为:质量百分数为1%胰蛋白胨,质量百分数为0.5%酵母提取物,质量百分数为1%NaCl,pH 7.5;培养条件为:30℃,150r/min振荡培养20h;

种子罐发酵和发酵罐发酵液体培养基配方为:质量百分数为3%玉米浆,质量百分数为2%葡萄糖,质量百分数为0.2% K_2HPO_4 ,质量百分数为0.2%MgSO₄·7H₂O,pH7.5;培养条件为:30-32℃,通风比为0.4~0.9:1,培养时间为25~30h,接种量5%-10%;

步骤二:放线菌和绿色木霉采用市售菌株,分别发酵扩培分别获得放线菌菌液和绿色木霉菌液。获得的放线菌菌液和木霉菌菌液中活菌菌数分别为 1×10^9 个/ml。

[0038] (3)组分之间的体积比为:保藏号为CGMCC No.11624的枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1。按上述体积比将三者混匀,即得到本发明所述的复合微生物菌剂。

[0039] 实施例5:本发明提供的复合微生物菌剂在酸化、盐渍化模拟实验田中对土壤改良情况。

[0040] 在严重酸化的土壤(pH=4.0)和盐渍化(土壤中硝酸盐氮含量500mg/kg)上采用本发明进行试验,小区面积10平方米,三次重复。整地前将微生物菌剂均匀喷施于土壤表层,微生物菌剂适宜用量为每亩50kg,然后翻耕混入耕层(0—20cm)土壤中,小区实验地块表层覆盖地膜。保证小区实验地块的地表温度在15—30℃,每5天浇水一次保证土壤湿度。每隔5d天检测土壤的pH值和硝酸盐氮含量。试验结果表明,施用本发明微生物菌剂35d后可将耕层土壤的pH从极酸性条件(4.0)提高至更适宜作物生长的范围(5.5—6.0),硝酸盐氮含量

去除率达到90.22%。实验数据见表2。

[0041] 表2:

施用后天数 (d)	0	5	10	15	20	25	30	35
pH 值	4.02	4.17	4.31	4.60	5.16	5.40	5.86	6.14
硝酸盐氮含量 (mg/kg)	500	403.43	356.81	294.56	165.28	108.91	89.24	45.72
硝酸盐氮去除率 (mg/kg)	0	19.3	28.6	41.1	66.9	78.2	82.15	90.36

实施例6:

选取临淄10年左右大棚,进行随机区组设计试验,试验设置4个处理,每个处理三个重复。对照为常规地块;处理1施用本发明所述含耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌的复合微生物菌剂;处理2为市售水产用反硝化枯草芽孢杆菌替代本发明的耐酸反硝化枯草芽孢杆菌KD203-3的复合微生物菌剂,枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1。处理3为市售农用枯草芽孢杆菌替代本发明的耐酸反硝化枯草芽孢杆菌KD203-3的复合微生物菌剂,枯草芽孢杆菌:放线菌:绿色木霉=6:3:1。处理1、处理2和处理3的微生物菌剂施用量均为50公斤/亩。处理后30天时每小区“S”型采集土样,并进行混合均匀等处理后,进行土壤pH、容重、硝酸盐氮含量的测定与比较。

由于市售普通农用枯草芽孢杆菌和市售水产用反硝化枯草芽孢杆菌不能适应温室大棚高盐高酸度的环境,表5中结果显示其对大棚土壤的硝酸盐去除率和土壤改良效果不佳。本发明提供的复合微生物菌剂具有突出优势,与处理2和处理3相比土壤的pH、容重、生物量等土壤指标均有显著提高,硝酸盐氮去除率分别比处理2和处理3提高了71.3%和254.1%。

[0042] 表5 耐酸反硝化枯草芽孢杆菌复合微生物菌剂功效对比

处理	pH	容重 (g/cm ³)	硝酸盐氮 含量	硝酸盐氮去 除率 (%)	生物量 (10 ⁷ cfu/g)
对照	4.61	1.18	481	-	0.89
处理 1	6.41	1.33	10	97.92	3.78
处理 2	5.27	1.25	206	57.17	2.39
处理 3	5.06	1.23	348	27.65	1.57

实施例7:

针对临淄种植13年的酸化、盐渍化温室大棚(pH4.21,容重1.16g/cm³)。对照为不做任何处理,四个处理均施用本发明所述含耐酸反硝化枯草芽孢杆菌的复合微生物菌剂,施用量为30、40、50、60公斤/亩作为基肥。每个处理三次重复,随机区组设计,分别于整地时将菌剂喷施于表层土壤,然后翻耕土壤使其混合均匀。处理后30天时每个小区按0-20cm土壤用棋盘式选取5个点进行土样混合,混合土样采用“四分法”,进行土壤pH、容重、硝酸盐氮含量的测定与比较,结果见表7。

[0043] 发明所述含耐酸反硝化的枯草芽孢杆菌的复合微生物菌剂以50公斤/亩作为基肥为最佳施肥量,除氮效果最好,对土壤酸碱度调节及土壤容重改善均为最优。

[0044] 表6:

处理	pH	容重 (g/cm ³)	硝酸盐氮 含量 (mg/kg)	硝酸盐氮 去除率 (%)
对照	4.21	1.16	481	13.49
处理 1	5.23	1.22	181	67.45
处理 2	5.43	1.23	113	79.67
处理 3	6.21	1.32	25	95.50
处理 4	5.65	1.28	140	74.82

实施例8:潍坊温室大棚

针对潍坊连续11年温室大棚土壤,施用本发明所述含耐酸反硝化枯草芽孢杆菌的复合微生物菌剂,施用量为50公斤/亩作为基肥。整地前将微生物菌剂均匀喷施于土壤表层,然后进行土壤的翻耕,将微生物菌剂混入耕作层土壤中,并保证微生物菌剂与土壤混合均匀。60天后对施复合微生物菌剂前后土壤10-15cm中土壤pH、微生物数量、土壤中酶活变化做比较,具体如下所示:

施用本发明所述含耐酸反硝化枯草芽孢杆菌的复合微生物菌剂后土壤pH、硝酸盐氮含量、微生物数量及土壤酶活的变化如下表(其中CK是指不施肥处理;对照组施用市售微生物菌剂)。

[0045] 表7:

处理	pH	细菌数 (10^6 cfu/g)	真菌数 (10^6 cfu/g)	放线菌数 (10^6 cfu/g)
CK	4.36	2.15	6.38	1.64
对照	4.52	3.71	8.15	1.83
本发明复合微生物菌剂	5.78	5.22	11.33	3.57

表8:

处理	硝酸盐氮 (mg/kg)		脲酶 (mg/g)	磷酸酶 (mg/g)	蔗糖酶 (mg/g)
	初始平均值	处理后			
CK	423	368	0.52	1.82	11.62
对照		314	0.63	2.31	14.87
ED203-3复合微生物菌剂		148	0.92	2.78	17.53

土壤pH值和积盐含量是土壤理化性质的重要指标,而土壤中的微生物数量和酶活是土壤生物活性的重要指标。通过表7和表8可以看出施用本发明的复合微生物菌剂使土壤pH提高到了5.78,硝酸盐氮含量降低了65.01%,使大棚土壤更加适合农作物的生长。施用本发明的复合微生物菌剂使土壤中细菌、真菌、放线菌的数量分别提高了142.8%、77.6%、117.7%,同时使土壤中脲酶、磷酸酶、蔗糖酶活性分别提高了76.9%、52.7%、50.8%,极大地提高了土

壤生物活性,对大棚土壤的改良有极大的改良效果。