

研究报告

保护剂与抑菌剂对生物肥料保存期的影响 *

吴皓琼^{1,2}, 牛彦波², 田洁萍², 沙长青^{2**}, 李景鹏^{1**}

(1. 东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036; 2. 黑龙江省科学院 应用微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘 要 在固氮菌、磷细菌、钾细菌等菌剂中加入 4 % 的糖蜜、2 % 的麸皮可显著提高产品的保存期。在同等条件下, 与对照相比, 固氮菌的保存期可提高至 12 个月以上, 磷细菌的保存期可提高 1 倍以上; 在以未灭菌的草炭作载体的微生物制剂中, 同时添加 4 % 糖蜜、2 % 麸皮及 2 ‰~4 ‰苯甲酸钠、0.5 ‰~1 ‰的多菌灵, 与对照相比, 产品的保存期可提高 50 % 以上。

关键词 微生物肥料; 保存期; 抑菌剂

中图分类号 S144

文献标识码 A

文章编号 1005 - 7021(2004)05 - 0050 - 04

目前, 我国微生物肥料行业生产的产品存在较多问题, 诸如有效活菌含量低, 杂菌率偏高, 有效期短等, 影响了市场的开拓和农民使用的积极性^[1]。关于载体对菌剂质量影响的研究已有报道^[2,3], 而保护剂与抑菌剂对微生物菌剂活菌数量的影响还未见报道。作者选择不同的保护剂及抑菌剂, 研究了它们对微生物菌剂活菌数量及保存期的影响, 希望研究结果能够对生物肥料生产厂家有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 解磷巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* P01, P02)、硅酸盐细菌 (*Bacillus mucilaginosus* K05, K07)、联合固氮菌 (*Alcaligenes faecalis* N002, *Klebsiella pneumoniae* N003), 生产菌株自编号, 本组分离保藏。

1.1.2 试剂 所用试剂均为化学纯或分析纯。

1.1.3 仪器设备 无菌工作台、QZX-C 空气浴振荡器、恒温培养箱、显微镜、高压灭菌锅等。

1.2 方法

1.2.1 菌剂的制备 将活化好的巨大芽孢杆菌、联合固氮菌、硅酸盐细菌斜面分别接种于灭菌的肉汤、阿须贝 (加酵母粉 1.0 g) 等液体培养基中^[4], 28 ~ 180 r/min 振荡培养 36 ~ 48 h。

1.2.2 载体的制备 选择草炭、褐煤作为载体, 过 80 目筛, 草炭用 CaO 调 pH 至中性, 121 °C 灭菌 1 ~ 2 h。

1.2.3 保护剂的筛选 在预选基础上, 选择蔗糖、玉米粉、糖蜜、麸皮、饼粉等作为保护剂的筛选对象。按一定比例加入到已培养好的发酵液中混匀, 按 5 % 的比例, 添加到载体中, 调水分, 放置 24 h 测定初始菌数。阴凉处放置 30 d, 再次测定活菌数, 以未添加保护剂的处理为对照 (CK)。设 7 个处理, 每处理 3 次重复, 见表 1。

表 1 保护剂的筛选 (单位: 占发酵液体积比/%)

处理	蔗糖	玉米粉	糖蜜	麸皮	饼粉
1	5			2	
2	5				2
3		5		2	
4		5			1
5			4	2	
6			4		1
7(CK)	0	0	0	0	0

1.2.4 添加保护剂对微生物菌剂有效活菌数及保存期的影响 将选定的保护剂按一定比例加入到培养好的发酵液中, 混匀, 以 10 % 的比例接种到灭菌的载体中调水分, 密封室温保存。放置 24 h 测定初始菌数, 每隔 1 ~ 2 个月测活菌数, 同时以未加保护剂的处理为对照 (CK)。

1.2.5 抑菌剂对固氮菌、磷细菌、钾细菌的影响

采用钢圈法。加入苯甲酸钠 (2 ‰, 4 ‰, 6 ‰水溶液)、多菌灵 (1/800, 1/1200, 1/1500, 1/2000 悬液), 每组处理 3 次重复, 28 °C 培养 48 h, 观察有无抑菌圈出现, 如无抑制反应为阴性, 以“-”表示, 有抑制以“+”表示, 强度: 强++++、较强+++、中等++、弱+。

1.2.6 多菌灵对霉菌抑制能力的测定 在

收稿日期: 2004 - 05 - 15

作者简介: 吴皓琼 女, 硕士生, 副研究员。现从事微生物肥料的研究与应用。

* 黑龙江省青年基金项目 (Q00CO32)

** 通讯作者

PDA^[4]培养基平板上,分别加入青霉、根霉、米曲霉(从肥料样品中分离)菌悬液 0.05 mL 涂布均匀后等分加入灭菌钢圈,在钢圈中分别加入多菌灵(1/800,1/1 200,1/1 500,1/2 000 悬液)3 次重复。28℃ 培养 5~7 d,观察多菌灵对上述各霉菌的抑制程度,如无抑制,以“-”表示,有抑制以“+”表示,强度:强++++、较强+++、中等++、弱+。

1.2.7 抑菌剂苯甲酸钠、多菌灵同时添加对生物菌剂的影响 在固氮菌、磷细菌、钾细菌的发酵液中分别按 2‰、4‰、6‰ 比例加入苯甲酸钠,混匀后,以 10% 的比例加入到未灭菌的草炭中,在草炭中以 0.2% 比例加入多种霉菌制剂,而后再以 1‰、2‰ 的比例加入多菌灵,混匀,放置 30℃ 温箱培养 24 h(以促进霉菌孢子的萌发)取出测定,6 d 后再测定有效活菌总数及霉菌数,以不加抑菌剂的处理为对照(CK),试验处理设定如下:处理 1(CK):只含固氮菌、磷细菌、钾细菌混合发酵液,无抑菌剂。处理 2:在处理 1 基础上加 1% 多菌灵、2% 苯甲酸钠。处理 3:在处理 1 基础上加 1% 多菌灵、4% 苯甲酸钠。处理 4:在处理 1 基础上加 1% 多菌灵、6% 苯甲酸钠。处理 5:在处理 1 基础上加 0.5% 多菌灵、2% 苯甲酸钠。处理 6:在处理 1 基础上加 0.5% 多菌灵、4% 苯甲酸钠。处理 7:在处理 1 基础上加 0.5% 多菌灵、6% 苯甲酸钠。

1.2.8 测定方法 活菌数、杂菌数的测定为平板法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 保护剂的筛选试验(表 2)

表 2 营养物质筛选试验结果 菌数($\times 10^8$ 个/g)

处理	初始 总菌数	30d 后活 菌总数	比初始 ±%	比 CK ±%
1	3.1	7.9	154.8	75.6
2	2.9	7.0	141.3	55.6
3	3.1	6.1	96.7	35.6
4	3.2	6.6	106.2	46.7
5	2.9	8.8	203.4	95.6
6	3.1	7.4	138.7	64.4
7(CK)	3.2	4.3	34.4	-

从表 2 可知,添加保护剂,有利于微生物细胞的分散与生存,产品的有效活菌数不仅比初始菌数高 96.7%~203.4%,而且与 CK(未加保护剂)相比,亦提高了 35.6%~95.6%,尤其以处

理 5(糖蜜 4%、麸皮 2%)最佳,因此选定其作为保护剂。

2.2 保护剂对生物菌剂活菌数与保存期的影响

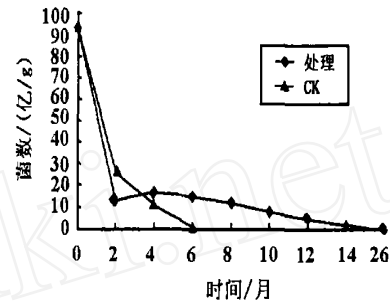


图 1 保护剂对微生物肥料固氮菌活菌数保存期的影响

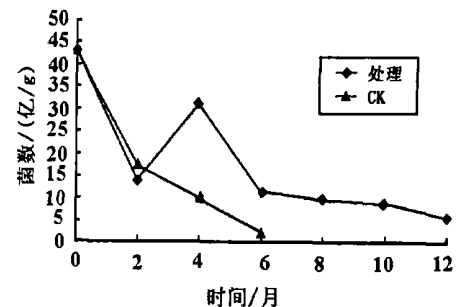


图 2 保护剂对生物肥料固氮菌活菌数保存期影响

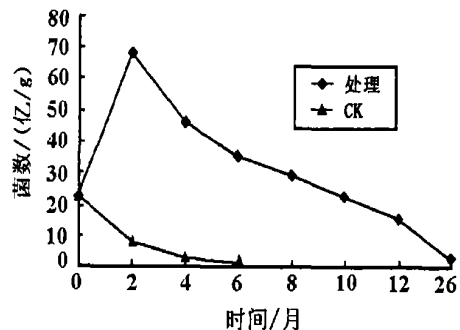


图 3 保护剂对微生物肥料磷细菌活菌数保存期的影响

结果见图 1。从图 1 可知,在微生物菌剂中添加适宜的保护剂可以大大提高活菌数及产品保存期。在同等存放条件下,与不加保护剂的对照组,固氮菌活菌数降低速度缓慢,保存 4 个月时有效活菌数较 2 个月略有提高,菌剂保存期从 4~6 个月可提高到 12 个月以上,而对照组 4~6 个月已降至 4×10^7 个/g, 2.4×10^8 个/g;磷细菌保存期比对照组提高 1 倍以上,保存 26 个月磷细菌活菌数仍达 2.0×10^8 个/g,而对照组只有 3.6×10^7 个/g。此外微生物肥料液体发酵水平

的高低,影响产品的保存期,发酵水平越高,保存期相对越长。对固氮菌(非芽孢杆菌)来说,添加保护剂不会引起活菌数的提高,只是将其维持在一定水平上并保持较长时间,而对磷细菌(芽孢杆菌)来说,加入保护剂后,在较长时间内(4个月)其活菌数高于初始菌数,可能是加入保护剂后促使芽孢萌发、生长、繁殖的缘故。

2.3 抑菌剂对固氮菌、磷细菌、钾细菌的影响

培养 48 h 取出观察。各平板上没有出现抑菌圈,在钢圈周围菌落大小、颜色、生长速度无异常。可见,苯甲酸钠、多菌灵此稀释液浓度对固氮菌、磷细菌、钾细菌的生长无抑制,可作为该种微生物菌剂的抑菌剂使用。

2.4 多菌灵对霉菌抑制能力的测定(表 3)

表 3 多菌灵对霉菌抑制能力的测定

多菌灵浓度	青霉	曲霉	根霉	霉(未知)
1/800	++++	++++	+++	+++
1/1 200	++++	++++	+++	+++
1/1 500	++++	++++	++	+++
1/2 000	++++	++++	+ ¹⁾	+++

注: ¹⁾ 抑菌圈直径平均为 1.34 cm,其余超过 2.2 cm

从表 3 可知,多菌灵对多种霉菌特别是对微生物产品中存在的霉菌有较强的抑制作用。其中,在 1/800 ~ 1/2 000 浓度范围内对霉菌抑制能力较强。

2.5 同时添加苯甲酸钠、多菌灵对微生物菌剂中杂菌(霉菌)的影响(表 4)

从表 4 可知,培养 1 d 后测定,除处理 4、处理 7 抑制能力较差外,其余处理对霉菌的抑制能

力无显著差异,与对照比,对霉菌的抑制率在 35.7 % ~ 40.5 % 之间;放置 7 d 后测定,抑菌剂杀菌效果显著,且各处理间无明显差异,霉菌死亡率在 93.3 % ~ 96.5 % 之间,最高达 96.5 %。与对照比,有效活菌总数有所增加,达 8.3 % ~ 50 %。综合两项指标,可确定苯甲酸钠浓度在 2 ‰ ~ 4 ‰,多菌灵浓度在 0.5 ‰ ~ 1 ‰ 间能达到很好的抑菌效果。

表 4 抑菌剂对生物菌剂质量的影响

(单位:活菌数/1 × 10⁸ 个/g)

处理	有效活菌数 与 CK 比			霉菌数 与 CK 比减少/ %			
	1d	2d	增加/ %	1d	2d	1d	2d
1	2.8	1.2	-	0.42	0.24	-	-
2	3.3	1.8	5.0	0.27	0.009 5	135.7	96.5
3	3.1	1.6	33.3	0.26	0.013	38.1	94.5
4	2.7	1.3	8.3	0.4	0.012	4.8	95.0
5	3.1	1.6	33.3	0.27	0.009 5	35.7	96.5
6	2.8	1.6	33.3	0.25	0.012	40.5	95.0
7	3.4	1.3	8.3	0.38	0.016	9.5	93.3

2.6 同时加入保护剂与抑菌剂对微生物菌剂保存期的影响

分别培养固氮菌、磷细菌、钾细菌,培养结束后菌液混合,加入保护剂(糖蜜 4 %、麸皮 2 %)和抑菌剂(苯甲酸钠 4 ‰、多菌灵 1 ‰)吸附于未处理草炭中混匀、包装。以不加保护剂与抑菌剂的处理为对照(CK)。共 3 批次,阴凉处保存。每隔 1 ~ 2 个月测定有效活菌数及杂菌率。结果见表 5。

表 5 保护剂、抑菌剂的加入对生物菌剂的影响

时间/月		有效活菌数/(1 × 10 ⁸ 个/g)					杂菌率/ %				
		1	2	3	平均	t 值	1	2	3	平均	t 值
2	处理	4.7	5.3	4.4	4.8	8.53 * *	5.3	4.9	3.6	4.6	7.985 8 *
	CK	2.5	2.3	2.3	2.36		8.2	9.3	7.9	8.46	
4	处理	-	-	-	-	22.76 * *	-	-	-	-	7.391 *
	CK	0.94	0.86	0.98	0.926		14.9	20.2	16.2	17.1	
6	处理	2.8	2.4	2.6	2.6	22.76 * *	8.1	5.7	7.2	7	7.391 *
	CK	0.062	0.049	0.061	0.057		22.3	28.7	26.9	25.9	
8	处理	2.2	2.0	2.2	2.13	22.76 * *	8.2	9.6	13.6	10.46	7.391 *
	CK	<0.005	-	-	-		-	-	-	-	

注: $T_{0.01} = 9.925$, $t_{0.05} = 4.303$, * 差异显著, * * 差异极显著

由表 5 可见,在同等存放条件下,2 个月时有有效活菌数处理组与对照组相比差异显著($t = 8.53 > t_{0.05} = 4.303$),4 个月后达到差异极显著($t = 22.76 > t_{0.01} = 9.925$),杂菌率达到显著水平($t = 7.985 8, 7.391 > t_{0.05} = 4.303$),产品保存 6 个月

后,处理组有效活菌总数在 2.0×10^8 个/g 以上,且杂菌率大大低于对照组,小于 10 %,产品保存期大于 6 个月,比对照保存期延长 1 倍以上。

3 小 结

在实际生产中,在生物菌剂中加入保护剂与抑制剂是提高微生物产品有效活菌、延长保存期

的有效手段。与常用的微生物菌株保护剂如蔗糖、甘油、血清、氨基酸等相比,用糖蜜、麸皮作为

保护剂,具有成本低,使用方便的优势,更适宜在生产中应用,将继续进行研究。

参 考 文 献

- [1] 葛诚. 微生物肥料生产应用基础[M]. 北京:中国农业出版社, 2000, 18.
- [2] 李永兴, 匡柏健, 李久蒂, 等. 不同载体对微生物菌剂质量的影响[J]. 土壤肥料, 1999, (6): 30~32.
- [3] 牛彦波, 吴皓琼, 李智, 等. 载体灭菌方式、及 pH 对生物肥料产品活菌数及保存期的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2003, (3): 36~39.
- [4] 沈萍, 范秀蓉, 李广武, 等. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 1999, 214~215.
- [5] 中华人民共和国农业行业标准:微生物肥料 NY227-94[S]. 北京:中国标准出版社, 1994.

The Effect of Nutritious Substance and Bacteriostatic Agent on the Shelf-life of Biofertilizer

WU Haoqiong^{1,2}, NIU Yanbo², TIAN Jieping², SHA Changqing², LI Jingpeng¹

(1. Agricultural University Heilongjiang Harbin 150036; 2. Heilongjiang Research Institute of Applied Microbiology, Harbin 150010)

Abstract Add 4 % molasses and 2 % wheat bran to the *Azotobacter*, the shelf life of *Bacillus phosphaticum* or *Bacillus mucilaginosus* solution can be significantly improved. Under the same condition, compared with the control group, the shelf life of *Azotobacter* can be extended to over 12 months and that of *Bacillus phosphaticum* is more than doubled. In micro-organism solutions that use unpasteurized peat as the carrier, when add 4 % molasses, 2 % wheat bran and 2 %~4 % sodium benzoate as well as 0.5 %~1.0 % carbendazim, the shelf life is extended by at least 50 % over that of the control group.

Keywords biofertilizer, shelf life, bacteriostatic agent.

论文摘要

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 基因组的末端鉴定

黄建军, 胡晓梅, 申晓冬, 李明, 周颖冰, 饶贤才, 胡福泉

(第三军医大学基础部微生物学教研室 重庆市微生物工程重点实验室, 重庆 400038)

中图分类号 Q939.11⁺2; Q939.48

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2004)05-0053-01

在噬菌体全基因组测序工作中,基因组结构性质和末端鉴定是一个重要内容,只有在明确了末端的性质与结构之后,对一个生物体的测序工作才告结束。噬菌体 PaP2 是我室新近分离的 1 株溶原性铜绿假单胞菌噬菌体,以噬菌体 PaP2 基因组为模板,经过鸟枪法随机测序和重叠群组装拼接之后得到的是一个全长为 43 783 bp 的表现为“环状”的 dsDNA 基因组,基因组在自然状态下的固有形状需要用实验证实。用在基因组上仅有一个切点的限制性内切酶 Aat⁺ 和只有 2 个切点的限制性内切酶 ScaI 进行酶切反应,之后将噬菌体基因组的物理图谱和电子酶切

图谱进行比较,结果表明,PaP2 基因组是线性双链 DNA(dsDNA)。于是回收 Aat⁺ 酶切基因组产生的 5'末端片段,用 S1 Nuclease 切除粘着序列,使突出末端平端化,以切平和未切的末端片段为模板,在基因组负链上设计引物进行测序,结果证实 PaP2 具有 5'突出的粘性末端,基因组 5'末端的粘着序列是:5'-TCAAGGCTATAGTGGTC-3',基因组 3'末端的粘着序列是:5'-GACCACTATAGCCTGA-3',二者反向互补。PaP2 基因组性质以及粘端序列的确定,为基因组的生物信息学分析、噬菌体的改造和利用等奠定了基础。

欢迎投稿

欢迎订阅