



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104726378 B

(45)授权公告日 2018.07.10

(21)申请号 201510140215.8 *A01P 21/00*(2006.01)  
(22)申请日 2015.03.30 *A01G 20/00*(2018.01)  
(65)同一申请的已公布的文献号 *C12R 1/125*(2006.01)  
申请公布号 CN 104726378 A *C12R 1/07*(2006.01)  
*C12R 1/82*(2006.01)  
(43)申请公布日 2015.06.24 审查员 翟羽佳  
(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 赵树兰 多立安 高星星  
(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.  
*C12N 1/20*(2006.01)  
*C12N 1/14*(2006.01)  
*A01N 63/04*(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法

(57)摘要

本发明公开了一种采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法。其中的强化耐盐微生物菌剂它是由重量份数比为1:1:1的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉组成；所述的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉指的是采用逐步增加盐浓度的方法逐级驯化得到的耐盐混合微生物菌群。本发明进一步公开了强化耐盐微生物菌剂在提高盐胁迫草坪草高羊茅保护酶活性方面的应用，实验结果显示：复合强化微生物菌剂可有效缓解盐碱土对草坪草的伤害；筛选和培养相应的强化耐盐堆肥微生物菌种，并进行人工接种，是提高草坪草的耐盐性的一条新出路。

1. 强化耐盐微生物菌剂在提高盐胁迫草坪高羊茅保护酶活性方面的应用,其中所述保护酶指的是SOD、POD和CAT;所述的强化耐盐微生物菌剂,是由重量份数比为1:1:1的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉组成;所述的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉指的是采用逐步增加盐浓度的方法逐级驯化得到的耐盐混合微生物菌群,所述方法如下:

(1) 配制质量百分比浓度分别为0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%和3%的NaCl溶液备用;

(2) 在驯化过程中,视含有枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉的混合微生物的OD<sub>600</sub>数值增长而逐步提高盐浓度,NaCl的浓度以5g/L的梯度增加到30g/L,每增加一次NaCl的浓度,待菌体增长量稳定后,继续增加NaCl的浓度,逐级驯化出耐盐混合微生物菌群;

(3) 强化混合微生物的分离及纯化:

(a) 将蛋白胨琼脂培养基、高氏I号琼脂培养基、马丁氏(PDA)琼脂培养基高温灭菌后,冷却至55-60℃时,在马丁氏琼脂培养基中加入终质量浓度为30μg/ml链霉素溶液,混均匀后分别倒平板;

(b) 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;

(c) 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;

(d) 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;

(e) 平板划线分离: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;

(f) 提取纯化后菌种的DNA进行鉴定,最终获得纯的强化耐盐的枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉;

(4) 强化耐盐菌种培养:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,选取对数生长期的菌种配置强化复合微生物菌剂。

2. 强化耐盐微生物菌剂在降低草坪高羊茅叶片中脯氨酸含量方面的应用,所述的强化耐盐微生物菌剂是权利要求1中所述的由重量份数比为1:1:1的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉组成强化耐盐微生物菌剂。

## 采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于环境保护技术领域,涉及采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法。

### 背景技术

[0002] 微生物菌剂尤其是由多种微生物组成的复合微生物菌剂是近年来发展起来具有广泛应用前景的生物技术。微生物菌剂不仅可以修复石油污染的土壤和降解水体中的有机污染物,还可以防治病虫害,促进作物生产和增产增收,有些微生物菌剂可以提高植物的抗逆性自20世纪70年代以来,欧美日本等国家或地区都相继研制成功了一些复合菌剂,很多已经开始进行大规模的生产,并形成了系列化的产品。其中20世纪80年代由日本琉球大学教授研制的EM(有效微生物群)获得了极大的成功,已经广泛应用在90多个国家涉及植业养殖业及环境净化方面,并取得了显著的经济效益和社会效益。基于微生物菌剂在一些发达国家研究和推广得较早,相关技术较为成熟,应用也更普遍。近年来,国外也没有再出现像EM那样可以在全世界都引起很大效应的微生物菌剂。

[0003] 相对于国外发达国家相关微生物菌剂的研究,我国是从20世纪80年代才开始微生物菌剂的相关研究,从理论到实践,从单一菌种的利用到多个菌种的复合应用,也相继取得了一些成果。南京农业大学生物防治产品主要有防治黄瓜根结线虫病害的蜡质芽孢杆菌AT31菌剂(使命/线灭,LS20120060)、防治蔬菜土传病害的微生态制剂(蔬得康)、宁盾系列产品,已获生物肥料正式登记。山东生物所木霉菌剂(防治灰霉病)、湖南植保所光合细菌(促进光合作用)、镇江润州短吻杆菌(防治鳞翅目害虫)以及宁夏诺得曼生物技术公司根瘤菌(促进豆科植物生长)等。最近几年,国内有很多关于复合菌剂研制的报道,主要利用微生物净化环境,降解有机污染、提高粮食产量和提高植物抗性等方面。有研究表明利用从水产养殖的优良水质中分离得到的优势菌种研制出水质净化剂,将其用于淡水鱼养殖池中,对降低水体中的COD,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , 亚硝酸盐等起到了理想的效果。还有研究表明,微生物菌肥均能在适宜的浓度下不同程度的促进生菜的生长,改善生菜品质,降低硝酸盐含量。但这些大都还处于试验研究与初步应用水平,还没有广泛应用于实际。生防菌本身具有固氮、解磷、解钾的作用,刺激植物产生适量生长素;降解大分子有机物,提高有机肥利用率;微生物菌剂就像是植物的开胃剂;保护细胞膜的完整性、维持较高水平的根系活力和叶绿素含量,这方面就不光是一个促生的作用,也有一种抗逆的作用。微生物菌剂诱导植物体内多种抗逆基因的表达,显著提高植物体的抗氧化酶活性。同时微生物菌剂可以防止作物收获后产生病害,诱导抗逆基因表达,诱导SOD等多种相关物质的产生。所以,微生物菌剂对于改善植物在逆境即盐胁迫、干旱胁迫和低温胁迫条件下的建植有积极的影响。

[0004] 草坪草除了具有美化环境、净化空气、防止水土流失、保持生态平衡、给人们提供休息和运动场所等功能外,尚有调节小气候的作用。然而草坪草同其它植物一样,常遭受不良环境的影响,如干旱、高温、低温、盐渍等逆境都会抑制草坪草的生长,使草坪质量下

降。尤其是盐碱、低温(冷害)和干旱是强烈限制草坪生长的3大非生物因素。

[0005] 盐渍化土壤在世界各地都有广泛的分布,全世界盐渍化土地面积约为 $955 \times 106 \text{hm}^2$ ,约占陆地总面积的10%。目前,我国有 $20 \times 106 \text{hm}^2$ 以上盐碱地和 $7 \times 106 \text{hm}^2$ 以上盐渍化土壤,约占耕地面积的20%。而盐碱逆境胁迫是限制草坪草生长的一个主要环境因素之一。土壤盐渍化对植物的危害主要表现在抑制植物生长,破坏光合作用功能、造成细胞膜伤害、保护酶活性降低等。长期以来,盐碱土的改良主要采用的是灌溉排水、施加化学改良剂或一些矿质肥料和种植耐盐碱的植物。近年来,微生物菌剂在改良盐碱地的应用也成为了研究的热点。施用微生物菌剂后盐碱土的细菌总数有所增加,土壤的容重降低明显。即改善了土壤微生物区系,提高生物活性。有研究表明对表土层和5cm土层滨海盐碱土壤施用活性微生物菌剂,结果表土层硫酸盐含量显著降低,而氯化盐含量下降需要较高菌剂浓度。5cm土层硫酸盐升高明显,氯化盐变化较小,最终土壤酸碱度降至中性。这就说明微生物菌剂可以降低土壤盐碱度,提高养分利用率。总体来看,微生物菌剂在盐渍化土壤中表现出较好的效果,这充分显示了微生物菌剂在盐碱地改良上的应用潜力。

[0006] 城市生活垃圾堆肥是自然界中的微生物,比如说是细菌和真菌等,通过它们的生理代谢,可以加快对有机物的分解速度,进而将其变成腐植酸的过程。城市生活垃圾堆肥有氧处理过程中,会产生大量的热量,垃圾中的有机物被分解完成,同时也杀死了垃圾中的病菌等,而产芽孢的杆菌能够大量存在。各种微生物对有机物分解能力和分解速度是不尽相同的,随着温度、季节的变化,堆肥过程中的微生物群落和数量亦不相同;且已有研究表明,堆肥中的微生物群落是相当复杂的。堆肥中微生物数量及种群分布与堆肥有机物质成分和含量、微生物间的相互作用等多种因素密切相关。有人研究接种外源菌剂对堆肥中微生物数量和酶活性变化的影响,为微生物菌剂的应用和堆肥工艺的改进提供了依据。猪粪秸秆堆肥复合微生物菌剂能够更有效地促进和优化堆肥过程迅速提高堆体温度提高最高温度延长高温期时间并能更有效地提高堆体养分水平。牛粪堆肥试验表明,添加本源菌剂能快速提高堆肥温度,促进堆体发酵腐熟,缩短堆制时间;从纤维素和半纤维素降解率看,添加菌剂处理后明显比未添加菌剂的对照处理强,由此可见,添加微生物菌剂有利于牛粪堆肥腐熟。而针对从固体废气物基质中提取微生物菌种,并将其用于实验和生产中,还有人分别从鸡粪发酵和牛粪中筛选出高效降解菌并配制成相应的复合微生物菌剂,为复合微生物菌剂的应用奠定了一定的基础,这对前期堆肥微生物菌剂的配置都提供了依据。近期的相关文献及生产表明:微生物菌剂作为成为一种新型的生物技术已经应用到我们的社会生活和生产当中。尤其是微生物菌剂在促进植物生长、提高植物抗性等方面的研究不胜枚举。但是关于微生物菌剂的来源与制备,大多数研究者也仅仅只限于从土壤或污泥中提取和筛选。有关堆肥中微生物菌落结构、堆肥菌种之间共生及相互影响关系具有模糊性和复杂性。强化制备垃圾堆肥中微生物菌种,将强化堆肥微生物菌种作为接种剂,配制成不同浓度的强化复合微生物菌剂接种应用,将具有重要的意义。

[0007] 从生活垃圾堆肥(以下简称堆肥)中筛选出有效菌株,再配制成相应微生物菌剂,具有广泛的应用前景。一些研究表明城市生活垃圾堆肥过程中发现,在有机物被分解的过程中,生物群落也发生了重要的变化,主要是致病菌大量减少,而产芽孢的杆菌则数量剧增。生活垃圾在经过高温发酵处理后得到的堆肥酸性变大而且含盐量变高,因此处于高渗体系环境中的微生物具有一定的耐酸、耐盐和耐高温特性。不论是一般的微生物菌剂,还是

堆肥微生物菌剂中菌种的选育,都是直接从自然环境(或堆肥)中筛选出有效的菌株,再配制成微生物菌剂应用于相应的领域。而将自然环境(或堆肥)中的微生物经过某些特定方向的强化,进而得到一些高效强化微生物菌剂的研究尚无报道。

[0008] 本技术方法就是采用逐步提高NaCl的浓度来强化城市生活垃圾堆肥中的微生物,最终筛选得到强化耐盐微生物菌剂。利用所得到的强化耐盐微生物枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉,并将它们配制成不同浓度的复合强化微生物菌剂,接种到草坪建植体系中,目的是为筛选强化耐盐复合微生物菌剂的最适浓度,并达到提高盐碱土基质建植的草坪草保护酶活性的目的。

## 发明内容

[0009] 为实现上述目的为发明公开了如下的技术内容:

[0010] 一种强化耐盐微生物菌剂,其特征在于,它是由重量份数比为1:1:1的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉组成;所述的强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉指的是采用逐步增加盐浓度的方法逐级驯化得到的耐盐混合微生物菌群。其中所述强化枯草芽孢杆菌、强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉菌落数在 $(2.01 \pm 0.13) \times 10^9/\text{mL}$ - $(2.45 \pm 0.07) \times 10^9/\text{mL}$ 之间;其中强化枯草芽孢杆菌的OD<sub>600 nm</sub>值为0.583,强化赖氨酸芽孢杆菌的OD<sub>600 nm</sub>值为0.603。

[0011] 本发明进一步公开了强化耐盐微生物菌剂在提高盐胁迫草坪草高羊茅保护酶活性方面的应用。所述保护酶活性指的是SOD、POD和CAT。同时也公开了强化耐盐微生物菌剂在降低高羊茅叶片中脯氨酸含量方面的应用;所述强化耐盐微生物菌剂指的是稀释100倍的强化耐盐微生物菌剂。

[0012] 本发明更进一步公开了强化耐盐微生物菌剂的制备方法,它是按如下的步骤进行:

[0013] (1)配制盐的浓度(w/w):分别配制NaCl的浓度:0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%和3%备用;

[0014] (2)在驯化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高盐浓度,NaCl的浓度以5g/L的梯度增加到30g/L,每增加一次NaCl的浓度,待菌体增长量稳定后,继续增加NaCl的浓度,逐级驯化出耐盐混合微生物菌群;枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉;

[0015] (3)强化耐盐菌种培养:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d,选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线;所述的液体培养基指的是马丁氏培养基;

[0016] (4)强化复合微生物菌剂制备:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d,选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线,选取对数生长期的菌种配置强化复合微生物菌剂,其中强化枯草芽孢杆菌,强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉的重量份数比为1:1:1;所述的液体培养基指的是马丁氏培养基。

[0017] 本发明还公开了采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法,

其特征在于按如下的步骤进行:

[0018] (1) 实验材料: 选用草坪草选取籽粒饱满、均匀一致的高羊茅 (*Festuca arundinacea* L.) 种子为试验材料;

[0019] 实验基质盐碱土取自河北省黄骅市海边, pH 8.0, 含盐量1.58%;

[0020] 校园土: pH为7.44, 含盐量0.29%, 有机质含量4.68 %, 全氮量0.21 %, 有效磷含量  $22.03\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 全钾  $45.61 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 容重  $0.46 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 饱和含水量  $0.58 \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;

[0021] (2) 强化复合微生物菌剂制备: 将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养, 枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在  $30^{\circ}\text{C}$ , 180r/min培养1d, 产黄青霉在  $28^{\circ}\text{C}$ , 220r/min培养3d, 选用600 nm(真菌用560 nm) 波长进行比浊测定, 以菌悬液的OD值为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘制微生物的生长曲线, 选取对数生长期的菌种配置强化复合微生物菌剂, 其中强化枯草芽孢杆菌, 强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉的重量份数比为1:1:1; 所述的液体培养基指的是马丁氏培养基;

[0022] (3) 强化复合微生物菌剂的应用: 将盐碱土按照盐胁迫处理水平: 轻度含盐量为0.3%, 中度含盐量为0.6%和重度含盐量为0.9%。

[0023] (4) 草坪草盐胁迫建植

[0024] 以灭菌土壤作为基质, 建植地毯草皮基质厚度为15-18mm, 播种量为  $160-165\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ , 每天统一定量给水, 以保持培养基质有较好的水分状况, 并且应经常调换草皮培养位置, 以保证光照一致, 当植株生长高度达到6-7cm时, 加入强化复合微生物菌剂, 实验在温室植物培养台上进行, 温度为  $20-28^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度为35%-60%, 光照为自然光, 处理35d后进行植物各指标的测定; 所述的灭菌土壤指的是: 配制好的不同盐梯度的土壤, 在  $121^{\circ}\text{C}$  下灭菌30min。

[0025] 需要特别说明是:

[0026] 本发明所用到的枯草芽孢杆菌(保藏号CCTCCM207094)、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉市场上均有销售, 本发明的方法既可以采用市场上有售的枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉进行驯化制成强化复合菌剂, 也可以采用本发明公开的方法从生活垃圾堆肥中分离得到枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉, 然后再经过驯化制成复合菌剂。其得到的3个菌株的生化特性与市售的相同故未在保藏。

[0027] 本发明更加详细的描述如下:

[0028] 1 研制材料与amp;方法

[0029] 1.1 实验材料

[0030] 草坪草选取籽粒饱满、均匀一致的高羊茅 (*Festuca arundinacea* L.) 种子为试验材料。实验基质盐碱土取自河北省黄骅市海边, pH 8.0, 含盐量1.58%。校园土: pH为7.44, 含盐量0.29%, 有机质含量4.68 %, 全氮量0.21 %, 有效磷含量  $22.03\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 全钾  $45.61 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 容重  $0.46 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 饱和含水量  $0.58 \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0031] 1.2 垃圾堆肥中耐盐微生物的强化、分离、纯化和鉴定。

[0032] 培养基

[0033] 1) 富集培养基: 牛肉膏5g, 蛋白胨10g, NaCl 5g, 水1000ml, pH 7.4-7.6, 加15g琼脂成固体培养基;

[0034] 2) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏5g, 蛋白胨10g, NaCl 5g, 水1000ml, pH 7.0-7.2,

加15g琼脂成固体培养基；

[0035] 3) 高氏 I 号培养基：可溶性淀粉 20g,  $\text{KNO}_3$  20g,  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  0.5g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{FeSO}_4$  0.01g, 水 1000ml, pH 7.2-7.4, 加琼脂 20g 成固体培养基 (配置时, 先用少量冷水, 将淀粉调成糊状, 导入煮沸的水中, 在火中加热, 边搅拌边加入其他成分, 溶化后, 补水至 1000ml)；

[0036] 4) 马丁氏培养基：葡萄糖 10g, 蛋白胨 5g,  $\text{KHP0}_3$  1g,  $\text{MgSO}$  ( $7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5g, 1% 孟加拉红水溶液, 3.3ml, 水 1000ml, pH 自然, 加琼脂 15g 成固体培养基 (临用前加入 0.03% 链霉素稀释液 100ml, 使每 ml 培养基含链霉素 30 $\mu\text{g}$ )。

[0037] 菌种的富集

[0038] 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 $^\circ\text{C}$ , 220r/min 下振荡培养 3d, 即为混合微生物菌群。

[0039] 微生物的强化

[0040] 混合微生物菌群耐盐强化采用的是逐步增加盐浓度的方法, 以减轻瞬间高浓度盐对混合菌株造成的冲击和毒害。未经过驯化的混合菌群一般在 NaCl 浓度为 5g/L 的条件下生长较好, 而此次研究的目标 NaCl 浓度为 30g/L, 即在本研究中 NaCl 的浓度分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 和 3%。在驯化过程中, 视  $\text{OD}_{600}$  增长而逐步提高盐浓度, NaCl 的浓度以 5g/L 的梯度增加到 30g/L, 每增加一次 NaCl 的浓度, 要待菌体增长量稳定后, 才能继续增加 NaCl 的浓度, 逐级驯化出耐盐混合微生物菌群。

[0041] 强化微生物的分离及纯化

[0042] 稀释涂布平板法

[0043] 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 $^\circ\text{C}$  时, 在马丁氏琼脂培养基中加入链霉素溶液 (终质量浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 混均匀后分别倒平板。

[0044] 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  $10^{-1}$  稀释液, 以此类推制成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  几种浓度的稀释液。

[0045] 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。

[0046] 4) 培养：牛肉膏蛋白胨平板倒置于 37 $^\circ\text{C}$  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 $^\circ\text{C}$  培养箱中培养。

[0047] 平板划线分离法

[0048] 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培养, 如不纯, 仍需重复该步骤。

[0049] 强化微生物的鉴定

[0050] 按照 Ezup 柱式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 $\times$  Buffer (with  $\text{MgCl}_2$ ) 2  $\mu\text{L}$ , dNTP (10mmol/L) 0.4 $\mu\text{L}$ , 341f (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1 $\mu\text{L}$ , 534r (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1 $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (5u/ $\mu\text{L}$ ) 0.4 $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1 $\mu\text{L}$ , 加超纯水定容至终体积 20 $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件：94 $^\circ\text{C}$  5min 预变性, 94 $^\circ\text{C}$  变性 1min, 55 $^\circ\text{C}$  复性 45s, 72 $^\circ\text{C}$  延伸 45s, 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$  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。

#### [0051] 1.3复合微生物菌剂制备

[0052] 菌种培养:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养。枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d。选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线。选取对数生长期的菌种配置复合微生物菌剂,复合微生物菌液按以下处理进行配制。枯草芽孢杆菌,赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉按1:1:1的比例进行配置。

#### [0053] 4复合微生物菌剂应用

[0054] 将盐碱土按照不同比例与天津师1范大学校内正常园土混合。本实验采用四个盐胁迫处理水平:轻度(含盐量为0.3%,以下简称0.3%),中度(含盐量为0.6%,以下简称0.6%) and 重度(含盐量为0.9%、1.2%,以下简称0.9%、1.2%)盐碱土,分别用T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>和T<sub>4</sub>表示;不同浓度的复合微生物菌剂应用,在相应的盐度条件下设定处理方式:处理1为对照,接种相应的空白培养基(CK);处理2加入100倍稀释液的复合微生物菌剂(CM<sub>1</sub>);处理3加入200倍稀释液的复合微生物菌剂(CM<sub>2</sub>)。

#### [0055] 1.5草坪草盐胁迫建植

[0056] 实验材料选用的是我国北方比较常见的多年生高羊茅。所用基质为配制好的不同盐梯度的土壤。在121℃下灭菌30min,备用。

[0057] 实验时灭菌土壤作为基质,建植地毯草皮基质厚度约为15mm,播种量为160g·m<sup>-2</sup>。每天统一定量给水,以保持培养基质有较好的水分状况,并且应经常调换草皮培养位置,以保证光照一致,当植株生长高度达到6-7cm时,加入不同处理的复合微生物菌剂,各处理3次重复,实验在温室植物培养台上进行,温度为20~28℃,相对湿度为35%-60%,光照为自然光,处理35d后进行植物各指标的测定。

#### [0058] 1.6指标的测定

##### [0059] 1.6.1脯氨酸含量的测定

[0060] 采用酸性茚三酮比色法;称取0.5g叶片剪碎,分别置于大试管中,然后分别加入10 mL 3%的黄基水杨酸,沸水提取10 min,冷却后吸取2 mL于另一干净带塞试管,加入2mL冰醋酸及2mL酸性茚三酮,沸水中加热30 min,冷却用4 mL甲苯提取,3000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,取上层液于520 nm下测吸光值。结果计算:标准曲线查出2 mL测定液中脯氨酸含量(μg·mL),然后计算样品中脯氨酸含量百分数。公式如下:

$$[0061] \quad \text{单位鲜重样品脯氨酸含量} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{X \times 2.5}{\text{样品鲜重}}$$

式中, X 为520nm处吸光值所对应的脯氨酸的浓度(μg·mL)



[0062] 1.6.2 丙二醛(MDA)含量的测定

[0063] 采用硫代巴比妥酸法;称取0.5 g叶片,用10%TCA提取,定容10 mL,4000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上层液2 mL再加入2 mL的0.6%TBA,沸水中15min,离心10 min,取上清液于532 nm和450 nm下测吸光值。

[0064] 1.6.3 保护酶活性测定

[0065] 粗酶液提取:准确称取0.5 g鲜叶,用磷酸缓冲液(PBS,pH7.8)冰浴研磨提取,定容25 mL,取10 mL于离心管中,10000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,上清液为粗酶提取液。

[0066] 过氧化物酶(Peroxidase,POD)活性测定采用愈创木酚法,取3mL反应混和液于比色皿中,对照以pH=7.8磷酸缓冲液代替,向比色皿中加0.1mL粗酶提取液,立即开启秒表计时,于470nm下测量吸光值,每分钟读1次数,共读3次。以每分钟 $\Delta A_{470}$ 变化0.01为一个过氧化物酶活性单位。反应混和液成分为50mL pH=6.0的磷酸缓冲液加28 $\mu$ L愈创木酚和19 $\mu$ L过氧化氢。

[0067] 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)活性测定采用NBT法),采用NBT法。3mL反应混和液包括:pH=7.8的磷酸缓冲液,0.1mMEDTA,13mM蛋氨酸,75 $\mu$ M NBT,2 $\mu$ M核黄素和0.1mL酶提取液,不加酶液的为对照。在人工气候箱中照射15min,不加酶液和无光照得作为空白对照。然后迅速在560nm下测定吸光值。以抑制NBT光化还原的50%为一个酶活性单位。

[0068] 过氧化氢酶(Catalase,CAT)活性测定采用紫外分光光度法,于试管中加入1.5mL pH=7.8磷酸缓冲液、1mL蒸馏水、0.2mL酶提取液,对照用缓冲液代替酶液。然后在测定管中加0.3mL浓度为0.1mol·L<sup>-1</sup>过氧化氢,同时立即计时,迅速在240nm下测量吸光值,每分钟读1次数。以每分钟 $\Delta A_{240}$ 变化0.1为一个过氧化氢酶活性单位。

[0069] 1.7数据分析

[0070] 采用Microsoft Excel 2003和SPSS17.0软件进行处理。

[0071] 2 研制结果分析

[0072] 2.1菌种筛选

[0073] 本实验所选用的3种强化耐盐微生物分别为枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉。通过测定枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌的生长曲线(图1),依据微生物生长曲线可以判断其生长对数期,再将此期的菌种提取出来,配成不同处理,用于草坪植物的接种。

[0074] 将微生物菌剂中的枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌用平板菌落计数法测定菌种数量,产黄青霉则用纸片法测定。测定结果如表1,所得3菌种的菌落数在 $(2.01 \pm 0.13) \times 10^9/\text{mL}$ — $(2.45 \pm 0.07) \times 10^9/\text{mL}$ 之间,枯草芽孢杆菌的OD<sub>600 nm</sub>值为0.583,赖氨酸芽孢杆菌的OD<sub>600 nm</sub>值为0.603:

表1 微生物菌剂所含的菌落数

菌剂	1mL 菌落数	15 mL 菌落数	OD 值
	Colonies (number/mL)	Colonies (number/15mL)	
[0075] 枯草芽孢杆菌	$(2.15 \pm 0.03) \times 10^9$	$(3.23 \pm 0.03) \times 10^{10}$	$0.583 \pm 0.001$
赖氨酸芽孢杆菌	$(2.45 \pm 0.13) \times 10^9$	$(3.68 \pm 0.13) \times 10^{10}$	$0.603 \pm 0.003$
产黄青霉	$(2.01 \pm 0.07) \times 10^9$	$(3.01 \pm 0.07) \times 10^{10}$	-

[0076] 2.2 强化复合微生物菌剂对盐胁迫下高羊茅丙二醛和脯氨酸含量的影响

[0077] 盐胁迫下复合微生物菌剂处理高羊茅后,其叶片中的丙二醛含量均显著低于未接种复合微生物菌剂的对照组。不同盐梯度下都是在经过100倍稀释复合微生物菌剂处理后,高羊茅丙二醛含量降低的最多,分别比对照降低了32.39%、24.99%、29.35%。在200倍稀释液复合菌剂的处理下,高羊茅丙二醛含量和对照相比都有显著性差异( $P < 0.05$ )。

[0078] 表2 不同浓度盐胁迫下复合微生物菌剂对高羊茅丙二醛、脯氨酸含量的影响

测定指标	盐梯度	菌剂		
		CK	CM <sub>1</sub>	CM <sub>2</sub>
[0079] 丙二醛 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	0.3%	$64.58 \pm 1.61a$	$43.66 \pm 0.29c$	$47.33 \pm 0.78b$
	0.6%	$67.96 \pm 0.33a$	$50.98 \pm 0.41c$	$53.13 \pm 0.66b$
	0.9%	$74.48 \pm 0.45a$	$52.62 \pm 0.42c$	$57.47 \pm 0.76b$
脯氨酸 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	0.3%	$41.38 \pm 0.23a$	$27.83 \pm 0.49c$	$33.04 \pm 1.01b$
	0.6%	$48.06 \pm 0.25a$	$33.79 \pm 0.41c$	$36.29 \pm 0.40b$
	0.9%	$85.31 \pm 0.70a$	$64.87 \pm 0.54c$	$67.12 \pm 0.28b$

[0080] 不同浓度的强化复合微生物菌剂对盐胁迫下高羊茅叶片中脯氨酸含量的影响见表2。与对照相比,不同盐梯度下,接种强化复合微生物菌剂显著降低了高羊茅叶片中的脯氨酸含量。以施加稀释100倍的复合微生物菌剂效果最好,分别比对照降低了32.75%、29.69%、23.96%。而施加稀释200倍复合微生物菌剂的处理组的脯氨酸含量与对照相比,也存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

[0081] 2.3 复合微生物菌剂对盐胁迫下高羊茅保护酶活性的影响

[0082] 施加复合微生物菌剂显著提高盐胁迫下高羊茅叶片SOD、POD和CAT这三种保护酶活性(表3)。在施加稀释100倍的复合微生物菌剂时,高羊茅SOD、POD和CAT的活性达到最高,在轻度(0.3%)胁迫下,分别是对照组的2.7倍、1.2倍和1.7倍;中度(0.6%)胁迫下,是对照组的2.99倍、1.22倍和1.87倍;重度(0.9%)胁迫下,是对照组的3.54倍、1.08倍和2.34倍。复合微生物菌剂稀释200倍时,处理组高羊茅的这三种保护酶的活性与对照组相比也存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

[0083] 表3 不同浓度盐胁迫下复合微生物菌剂对高羊茅保护酶活性的影响

测定指标	盐梯	菌剂		
	度	CK	CM1	CM2
[0084] 超氧化物歧化酶 SOD (U · g <sup>-1</sup> )	0.3%	78.93 ± 4.67c	213.33 ± 3.47a	144.53 ± 5.51b
	0.6%	61.60 ± 4.87c	184.27 ± 4.63a	127.47 ± 7.51b
	0.9%	47.73 ± 3.28c	168.80 ± 5.14a	110.67 ± 6.03b
[0084] 过氧化物酶 POD (U g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0.6%	2545.00 ± 85.34c	3083.33 ± 47.79a	2756.67 ± 19.17b
	0.9%	2462.22 ± 147.18c	2669.33 ± 67.51a	2498.33 ± 3.33b
[0085] 过氧化氢酶 CAT (U mg · g <sup>-1</sup> )	0.3%	38.33 ± 1.95c	65.22 ± 1.83a	54.56 ± 1.68b
	0.6%	25.67 ± 2.03c	47.89 ± 1.75a	36.44 ± 0.62b
	0.9%	18.67 ± 1.73c	43.67 ± 3.40a	29.22 ± 1.85b

### [0086] 3 研制结论

[0087] 在盐胁迫下,接种强化复合微生物菌剂,能明显提高了保护酶活性从而缓解了盐胁迫对高羊茅带来的伤害,进而提高了高羊茅的耐盐性。复合微生物菌剂100倍稀释液的效果显著优于200倍稀释液。所以本技术所获得的复合强化微生物菌剂就可以有效缓解盐碱土对草坪草的伤害;筛选和培养相应的强化耐盐堆肥微生物菌种,并进行人工接种,是提高草坪草的耐盐性的一条新出路。

[0088] 附图说明:

[0089] 图1为枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌的生长曲线。

### 具体实施方式

[0090] 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。枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉均由市售,也可参考本发明公开的方法制备。

[0091] 实施例1

[0092] 强化耐盐微生物菌剂的制备方法:

[0093] (1) 配制盐的浓度 (w/w): 分别配制NaCl的浓度: 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%和3%备用;

[0094] (2) 在驯化过程中,视OD<sub>600</sub>增长而逐步提高盐浓度,NaCl的浓度以5g/L的梯度增加到30g/L,每增加一次NaCl的浓度,待菌体增长量稳定后,继续增加NaCl的浓度,逐级驯化出耐盐混合微生物菌群;枯草芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和产黄青霉;

[0095] (3) 强化耐盐菌种培养: 将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d,选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线;所述的液体培养基指的是马丁氏培养基;

[0096] (4) 强化复合微生物菌剂制备:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d,选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线,选取对数生长期的菌种配置强化复合微生物菌剂,其中强化枯草芽孢杆菌,强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉的重量份数比为1:1:1;所述的液体培养基指的是马丁氏培养基。

[0097] 实施例2

[0098] 采用强化耐盐微生物菌剂提高盐胁迫草坪草保护酶活性的方法:

[0099] (1) 实验材料:选用草坪草选取籽粒饱满、均匀一致的高羊茅(*Festuca arundinacea* L.)种子为试验材料;

[0100] 实验基质盐碱土取自河北省黄骅市海边,pH 8.0,含盐量1.58%;

[0101] 校园土:pH为7.44,含盐量0.29%,有机质含量4.68%,全氮量0.21%,有效磷含量22.03mg·kg<sup>-1</sup>,全钾45.61 g·kg<sup>-1</sup>,容重0.46 g·L<sup>-1</sup>,饱和含水量0.58 g·mL<sup>-1</sup>;

[0102] (2) 强化复合微生物菌剂制备:将筛选得到的强化耐盐微生物在相应的液体培养基上扩大培养,枯草芽孢杆菌和赖氨酸芽孢杆菌在30℃,180r/min培养1d,产黄青霉在28℃,220r/min培养3d,选用600 nm(真菌用560 nm)波长进行比浊测定,以菌悬液的OD值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制微生物的生长曲线,选取对数生长期的菌种配置强化复合微生物菌剂,其中强化枯草芽孢杆菌,强化赖氨酸芽孢杆菌和强化产黄青霉的重量份数比为1:1:1;所述的液体培养基指的是马丁氏培养基;

[0103] (3) 强化复合微生物菌剂的应用:将盐碱土按照盐胁迫处理水平:轻度含盐量为0.3%,中度含盐量为0.6%和重度含盐量为0.9%。

[0104] (4) 草坪草盐胁迫建植

[0105] 以灭菌土壤作为基质,建植地毯草皮基质厚度为15mm,播种量为160g·m<sup>-2</sup>,每天统一定量给水,以保持培养基质有较好的水分状况,并且应经常调换草皮培养位置,以保证光照一致,当植株生长高度达到6cm时,加入强化复合微生物菌剂,实验在温室植物培养台上进行,温度为25℃,相对湿度为45%,光照为自然光,处理35d后进行植物各指标的测定;所述的灭菌土壤指的是:配制好的不同盐梯度的土壤,在121℃下灭菌30min。

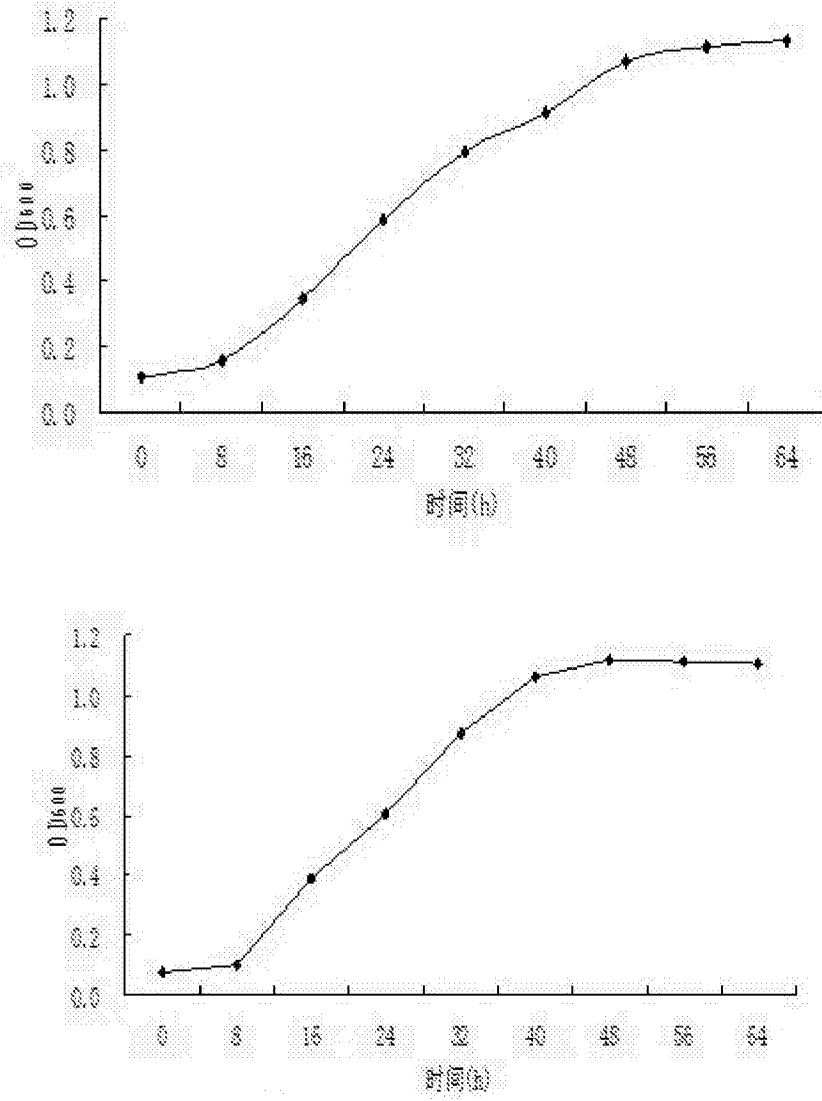


图1