

酸碱度和含水量对枯草芽孢杆菌生物 有机肥活性和效应研究

李娟, 汤莹, 赵旭

(甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了生产高品质的枯草芽孢杆菌生物有机肥料, 以腐熟羊粪为主要原料, 通过糠醛渣的添加量调节肥料的酸碱度(pH分别为6.00、6.50、7.00、7.50、8.00、8.88)来测定活菌数确定最佳配比, 并通过不同的水分含量来确定枯草芽孢杆菌生物肥料最佳含水量。结果表明, 用糠醛渣的添加量来调节生物有机肥料的酸碱度, 不同酸碱度对生物肥料中枯草芽孢杆菌活菌数影响不显著, 各处理保存到180 d后, 活菌数维持在 10×10^9 cfu/g左右。酸碱度对生物肥料中丝状真菌杂菌数的影响十分显著($P < 0.01$), 杂菌数先随着pH的升高而升高, 当pH为7.00时, 杂菌数最多, 达 6.17×10^6 cfu/g; 当pH大于7.00或者小于7.00时, 杂菌数减少。不同酸碱度的生物肥料对种子发芽指数有显著影响, 随着pH升高种子发芽指数降低, 说明生物肥料中pH过高会抑制根系的生长。随着水分含量的增加, 枯草芽孢杆菌的数量逐渐减少, 而肥料中丝状真菌杂菌数随着水分含量的增加而增加, 水分含量达到40%、保存180 d时杂菌数最多, 达 3.97×10^7 cfu/g; 水分含量小于10%时, 杂菌基本不生长。综合分析, 枯草芽孢杆菌生产生物肥料的最佳pH为6.00~7.00, 水分含量以小于20%为宜。

关键词: 酸碱度; 水分; 枯草芽孢杆菌; 生物有机肥; 有效活菌数; 杂菌数

中图分类号: S144

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2024)10-0955-05

doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2024.10.013

Effects of pH and Water Content on the Activity and Effectiveness of *Bacillus subtilis* Bio-organic Fertilizer

LI Juan, TANG ying, ZHAO Xu

(Institute of Soil, Fertilizer and Water-saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences,
Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to produce high-quality *Bacillus subtilis* bio-organic fertilizer, decomposed sheep manure was used as the main raw material, the pH value of the fertilizer was adjusted to 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 8.00 and 8.88 by adding furfural residue, and the optimal proportion was determined by measuring the number of live bacteria, and the optimal water content of the *Bacillus subtilis* bio-fertilizer was determined by different water contents. The results showed that adjusting the acidity and alkalinity of bio-organic fertilizers with rice bran aldehyde residue did not significantly affect the viable count of *Bacillus subtilis* in the biofertilizer. Regardless of the acidity and alkalinity, the viable count remained around 10×10^9 cfu/g after 180 days. The acidity significantly affected the count of filamentous fungi and miscellaneous bacteria in the biofertilizer ($P < 0.01$). The undesirable count increased with pH until it reached 7.00, with a maximum of 6.17×10^6 cfu/g. When the pH was greater or less than 7.00, the undesirable count decreased. Different acidity levels of biofertilizers had a significant impact on seed germination index, showing a decreasing trend as pH increased, indicating that excessively high pH in biofertilizers could inhibit root growth. As moisture content increased, the number of *Bacillus subtilis* gradually decreased, while the count of filamentous fungi and miscellaneous bacteria in the fertilizer increased. When the moisture content reached 40%, the count could reach up to 3.67×10^7 cfu/g. When the moisture content was below 10%, the count was minimal, suggesting that low moisture levels inhibit miscellaneous bacteria growth. In conclusion, the optimal pH for producing biofertilizers with *Bacillus subtilis* is between 6.00 and 7.00, with a moisture content below 20%.

Key words: pH; Moisture; *Bacillus subtilis*; Bio-organic fertilizer; Active cultivable count; Number of contaminant

收稿日期: 2024-03-14; 修订日期: 2024-09-23

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(23ZYQA0323); 甘肃省农业科学院科技成果转化项目(2023GAAS-CGZH01); 甘肃省农业科学院重点研发计划(2022GAAS16)。

作者简介: 李娟(1971—), 女, 甘肃永登人, 副研究员, 研究方向为农业废弃物资源化利用。Email: 466815228@qq.com。

糠醛渣是以玉米芯、玉米秆、稻壳、棉籽壳等农业废弃物为原料制备糠醛后的副产品，其主要成分为纤维素和木质素^[1-2]。糠醛渣具有较强的酸性，且有机质含量很高，可以增加土壤水稳性团聚体数量，疏松土壤，增加孔隙率，改善盐碱地盐渍化^[3-5]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种生防细菌，能够提高作物抗逆性、促进作物生长，治理农业污染，对多种作物的病虫害有良好的防治效果^[6-7]。在土壤质量改良方面，可以增加土壤有机质含量，增强土壤酶活性，降低土壤盐分含量^[8]。枯草芽孢杆菌生物肥料已经在水稻、玉米、百合、马铃薯、中药材、大白菜等多种作物上应用^[9-16]。但我国微生物肥料在生产工艺和技术方面存在诸多问题，如用于微生物肥料的载体质量较差^[17]，而载体对微生物肥料质量有关键影响^[18]。由于生物肥料是含有微生物的特定制品，利用微生物的代谢活动及产物为植物提供养分和生长发育所必需的物质，微生物是微生物肥料的核心，必须确保添加的功能微生物的生物活性，因此微生物肥料质量控制一直是最突出的问题。其中产品货架期短，功能菌有效活菌数偏低，有害杂菌较多，特别是霉菌灭活等问题尤为严重，阻碍了微生物肥料产品的商业化与应用效果^[19-20]。而影响微生物活性的因素很多，其中载体的酸碱度和水分是主要的影响因素，酸碱度的变化是通过糠醛渣与羊粪的不同配比来实现的。因此，我们以腐熟羊粪为主要原料，通过糠醛渣的添加量来调节肥料的酸碱度，以期研究出微生物生长良好的最佳配比，并通过不同的水分含量来确定枯草芽孢杆菌生物肥料最佳含水量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试熟羊粪(pH 8.88)、糠醛渣(pH 3.43)由甘肃普康生物科技有限公司提供，枯草芽孢杆菌菌粉(有效活菌数 $2\,000 \times 10^9$ cfu/g)由天津坤禾生物科技集团股份有限公司生产。

牛肉膏蛋白胨培养基：蛋白胨 10 g，NaCl 5 g，牛肉膏 3 g，蒸馏水 1 000 mL (固体培养基加 15 g 琼脂粉)，pH 7.2~7.4。

1.2 试验方法

1.2.1 不同酸碱度对生物肥料中活菌数的影响 试

验于 2022 年 10 月至 2023 年 8 月在甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所微生物实验室进行。共设 6 个酸碱度处理：pH 6.00(糠醛渣 1 : 羊粪 2)、pH 6.50(糠醛渣 1 : 羊粪 4)、pH 7.00(糠醛渣 1 : 羊粪 6)、pH 7.50(糠醛渣 1 : 羊粪 10)、pH 8.00(糠醛渣 1 : 羊粪 14)、pH 8.88(羊粪)。各处理分别按比例(质量比)混合均匀后，称取 1 kg 装入不锈钢盆中，每盆加入枯草芽孢杆菌 5 g 搅拌均匀后，分装到无菌的密封袋中，每袋约 30 g，封口后置于室温下保存。分别在接种后 10、30、60、90、120、150、180 d 用稀释平板法测定肥料中的活菌数和杂菌数。

1.2.2 不同水分含量对生物肥料中活菌数的影响

水分含量设置 6 个处理，分别为 10%(不加水)、20%、25%、30%、35%、40%，各处理称取 1.0 kg 生物肥料配方载体分别装入不锈钢盆中，每盆加入枯草芽孢杆菌 5 g，按试验设计再加入相应的水，搅拌均匀后，分装到无菌的密封袋中，每袋约 30 g，封口后置于室温下保存。用稀释平板法分别在接种后 60、90、150、180 d 测定肥料中的活菌数、在接种后 60、150、180 d 测定肥料中的杂菌数。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 载体中有效菌体释放率的测定 将菌剂放置在阴凉处保存，10 d 后取 10 g 样品加入装有 100 mL 无菌水的三角瓶中，在 200 r/min 下振荡 30 min，然后立即用稀释平板计数法(牛肉膏培养基)测定释放的菌数^[21]。用释放菌数(测定时载体实际的有效活菌数)与接种菌数相比计算释放率。

有效菌体释放率 = 载体释放出的活菌数 / 载体中接种菌数 × 100%。

1.3.2 种子发芽指数(GI)的测定 以未包衣的萝卜种子为指示材料，在有机肥料浸提液中培养，其种子发芽率和种子平均根长的乘积与在水中培养的种子发芽率和种子平均根长的乘积的比值。种子发芽指数以百分数(%)表示，计算公式为：

$$\text{种子发芽指数}(GI) = \frac{A1 \times A2}{B1 \times B2} \times 100\%$$

式中，A1 为有机肥浸提液培养的种子中种子发芽率，A2 为有机肥浸提液培养的全部种子的平均根长数值，B1 为水培养的种子中种子发芽率，B2 为

水培养的全部种子的平均根长数值。

1.4 数据处理

数据经 Microsoft Excel 2007 进行处理和计算^[22-23], 采用 DPS 统计软件对不同处理间差异显著性进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同酸碱度对枯草芽孢杆菌生物肥料中活菌数、杂菌数影响

2.1.1 释放率和活菌数 载体的菌体释放率是衡量载体质量的一个重要指标。从表 1 可知, 不同酸碱度的载体对枯草芽孢杆菌的菌体释放率影响不显著, 6 个处理的载体接种枯草芽孢杆菌 10 d 后, 菌体释放率为 98.6%~107.0%, 各处理间差异不显著。说明载体 pH 为 6.00~8.88 时对枯草芽孢杆菌的释放率基本没有影响。

表 1 不同酸碱度处理下生物肥料中枯草芽孢杆菌释放率

pH	接种量 /(10^9 cfu/g)	活菌数 /(10^9 cfu/g)	菌体释放率 /%
6.00	10.0	10.25 a	102.5 a
6.50	10.0	9.86 a	98.6 a
7.00	10.0	10.20 a	102.0 a
7.50	10.0	10.40 a	104.0 a
8.00	10.0	10.30 a	103.0 a
8.88	10.0	10.70 a	107.0 a

图 1 结果显示不同酸碱度对生物肥料中枯草芽孢杆菌活菌数影响不显著, 保存的时间对活菌数有一定的影响。各处理活菌数都是随着保存天数的增加而增加, 保存到 60 d 时活菌数达到最多, 为 $11.82 \times 10^9 \sim 14.00 \times 10^9$ cfu/g, 较保存 10 d 活菌数增加 13.7%~41.6%; 之后随着保存时间的增长, 各处理活菌数有所减少, 保存到 180 d 后, 各处理的活菌数下降至 10×10^9 cfu/g 左右, 处理间差异不显著。

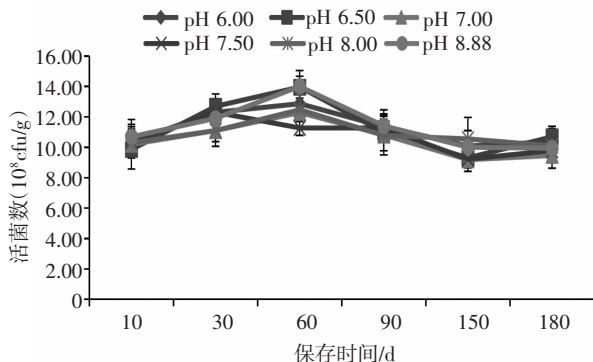


图 1 不同酸度处理下生物肥料中枯草芽孢杆菌活菌数随保存时间的动态变化

2.1.2 丝状真菌杂菌数 通过对室温下保存了 180 d 的枯草芽孢杆菌生物肥料中杂菌数的测定结果(图 2)表明, 酸碱度对生物肥料中丝状真菌杂菌数的影响十分显著, 杂菌数随着 pH 的升高呈先升高后降低趋势, 当 pH 为 7.00 时, 杂菌数最多, 达 6.17×10^6 cfu/g; 当 pH 大于 7.00 时, 杂菌数减少; pH 为 8.88 时, 杂菌数较少, 仅为 3.0×10^3 cfu/g。

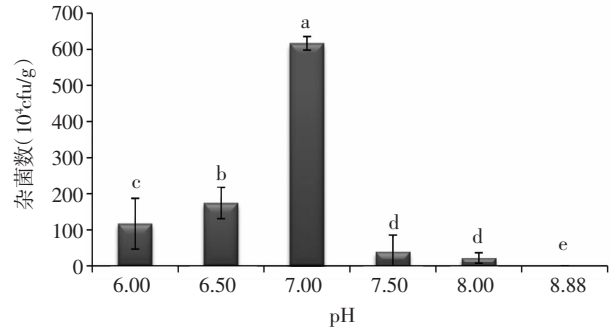


图 2 不同酸碱度对生物肥料中丝状真菌杂菌数的影响

2.1.3 种子发芽指数、根长和发芽率 从表 2 可以看出, 不同酸碱度的生物肥料对萝卜种子发芽指数有显著影响。随着 pH 升高, 种子发芽指数降低。pH 6.00 时, 种子发芽指数为 82.2%; pH 升高到 7.00 时, 种子发芽指数显著下降, 降至 70.3%, pH 7.00~8.88 处理的发芽指数较 pH 6.00 处理下降 11.9~26.0 个百分点。影响发芽指数的因子是根长和发芽率, 本试验中酸碱度对种子的发芽率无显著影响, 但对根长影响显著, 植株的根长随着 pH 的升高而降低。pH 6.0 时, 根长为 17.9 mm; 当 pH 为 8.88 时, 根长降至 13.6 mm, 降低幅度达 24.0%。说明生物肥料中 pH 过高会抑制根系的生长。

表 2 不同酸碱度处理下枯草芽孢生物肥料的种子发芽指数、根长和发芽率

pH	发芽指数 /%	根长 /mm	发芽率 /%
6.00	82.2 a	17.9 a	84.4 a
6.50	75.2 ab	15.7 b	88.9 a
7.00	70.3 b	15.6 bc	86.7 a
7.50	62.2 bc	14.0 c	81.1 a
8.00	56.2 c	13.7 c	86.7 a
8.88	57.0 c	13.6 c	87.8 a

2.2 不同水分含量对生物肥料中枯草芽孢杆菌活菌数、杂菌数影响

2.2.1 枯草芽孢杆菌活菌数 生物肥料中不同的含水量对枯草芽孢杆菌的活菌数有显著的影响(图

3)。在不同水分含量下，随着水分含量的增加，枯草芽孢杆菌的数量有减少趋势，水分含量 40% 时活菌数较水分含量 10% 减少 35.4% ~ 51.6%。在相同水分含量下，不同保存时间对枯草芽孢杆菌活菌数也有显著的影响，活菌数均随着保存天数的增加呈先增加后减少的趋势。水分含量为 10% 的处理 150 d 活菌数最多，达 16.1×10^9 cfu/g；当水分大于 10% 时，各处理的活菌数均以保存 90 d 时最多，为 $9.24 \times 10^9 \sim 12.23 \times 10^9$ cfu/g。保存 180 d 时，各处理的活菌数最少，较保存 90 d 减少 7.8% ~ 40.2%；与保存 60 d 相比，水分含量小于 25% 处理的活菌数差异不显著，当水分含量大于 25% 处理活菌数显著降低 ($P < 0.05$)。

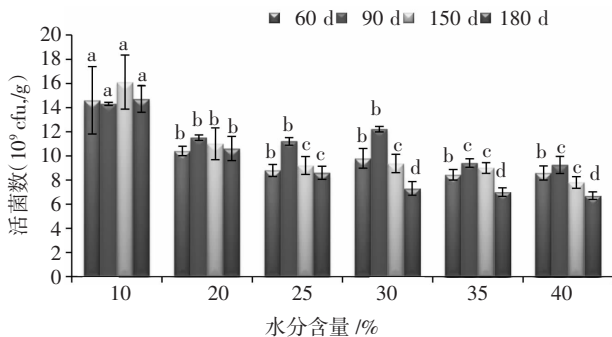


图 3 不同水分含量对肥料中枯草芽孢杆菌活菌数量的影响

2.2.2 生物肥料中杂菌数 不同水分含量条件下，对室温下保存的枯草芽孢杆菌生物肥料分别在 60、150、180 d 进行杂菌数的测定，结果 (图 4) 表明，生物肥料中水分含量对丝状真菌杂菌数的影响十分显著，杂菌数随着水分含量的增加而增加，60、150、180 d 的杂菌数以水分含量为 40% 时最多，分别为 3.65×10^7 、 3.68×10^7 、 3.97×10^7 cfu/g；当水分含量小于 10% 时，杂菌基本不生长。

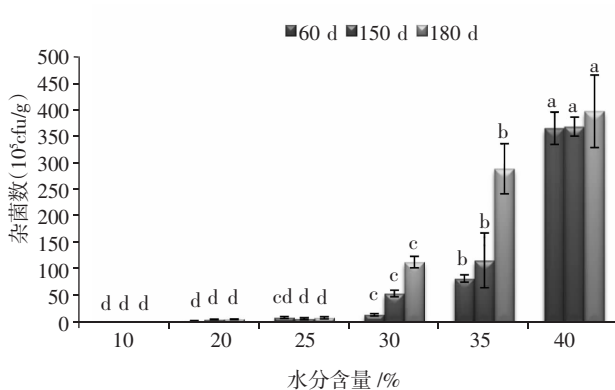


图 4 不同水分含量对肥料中杂菌数的影响

3 讨论与结论

生物肥料是以活性微生物为核心制成的菌剂，是一种辅助性、对作物有特定肥效和环境友好型的肥料 [24]，对化学肥料起到补充和替代的作用 [25]。生物肥料因其绿色环保、在多种作物上有良好的增产效果，还可以增加土壤养分有效性，改良土壤微生物生态结构 [26-27]，在我国具有很大的发展空间与潜力，将成为农业产业革命的新动能 [28]。但生物肥料在我国的发展还存在一些不足，主要表现在生物肥料货架期短，存活效果较差 [29]。但是到目前为止国内外关于这方面的技术研究较少。本研究通过对用糠醛渣和腐熟羊粪不同配比来调节生物有机肥料的酸碱度和水分含量来研究枯草芽孢杆菌生物肥料活菌数，pH 从 6.00 到 8.88 对生物肥料中枯草芽孢杆菌活菌没有显著的影响，保存到 180 d 后，各处理的活菌数维持在 10×10^9 cfu/g 左右，远远大于生物有机肥标准要求的活菌数 0.2 亿 cfu/g。酸碱度对生物肥料中丝状真菌杂菌数的影响十分显著 ($P < 0.01$)，杂菌数先随着 pH 的升高而升高，当 pH 达到 7.00 时，杂菌数最多，达 6.17×10^6 cfu/g；当 pH 大于 7.00 或者小于 7.00 时，杂菌数较少。虽然生物肥料的酸碱度对枯草芽孢杆菌活菌数没有显著影响，但对种子发芽指数有显著的影响，随着 pH 的升高发芽指数降低，当 pH 为 7.00 时种子发芽指数为 70.3%，说明生物肥料中 pH 过高会抑制根系的生长。

枯草芽孢杆菌生物肥料制备过程中，含水量也是一个十分重要的指标，对生物肥料的保藏时间和质量有着十分重要的作用。菌剂含水量过高容易造成杂菌污染的现象，严重影响产品质量及使用 [30]。本研究也验证了这一结果，枯草芽孢杆菌生物肥料中水分对丝状真菌杂菌数的影响十分显著，杂菌数随着水分含量的增加而增加，当水分含量达到 40%、保存 180 d 时杂菌数最多，达 3.97×10^7 cfu/g；当水分含量小于 10% 时，杂菌基本不生长。进一步说明水分增加，枯草芽孢杆菌数量减少的原因可能是杂菌抑制枯草芽孢杆菌的生长。因此，用糠醛渣和牛粪生产枯草芽孢杆菌生物肥料，生物肥料的 pH 应控制在 6.00 ~ 7.00，肥料中有效活菌数达 10×10^9 cfu/g 左右，种子发芽指数大于 70%。肥料的含水量控制在 20% 以下，

生物肥料中活菌数较高, 杂菌数量较少。

参考文献:

- [1] SUN Y, WANG Z, LIU Y, et al. A review on the transformation of furfural residue for value-added products[J]. *Energies*, 2020, 13(1): 21.
- [2] 尹玉磊, 李爱民, 毛燎原. 糠醛渣综合利用技术研究进展[J]. *现代化工*, 2011, 31(11): 22-24; 26.
- [3] 杜倩, 李琳, 刘铁男, 等. 复合菌肥对盐渍土壤微生物多样性的影响[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(2): 38-43.
- [4] 陈文涛, 郭丽琢, 刘斌, 等. 改良剂对盐碱地燕麦生长及土壤物理性状的调控效应[JOL]. *甘肃农业大学学报*, 1-2(2023-12-6)[2024-06-13]. <https://link.cnki.net/urlid/62.1055.s.20231205.1903.130.html>.
- [5] 杜文娟. 不同土壤添加剂对平罗县盐碱地的改良作用及对旱柳生长的影响[J]. *南方农业*, 2023, 17(5): 203-205.
- [6] 张洁, 朱仁胜, 王春芳, 等. 枯草芽孢杆菌在农业领域的应用研究进展[J]. *现代农业科技*, 2019(13): 163-170.
- [7] 周华飞, 杨红福, 姚克兵, 等. Fliz 调控枯草芽孢杆菌 Bs916 生物膜形成及其对水稻纹枯病的防治效果[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(1): 55-64.
- [8] 刘帅, 赵西宁, 李钊, 等. 不同改良剂对旱地苹果园壤土团聚体和水分的影响[J]. *水土保持学报*, 2021, 35(2): 193-199.
- [9] 凌志龙. 施用枯草芽孢杆菌菌肥对水稻产量及土壤养分含量的影响[J]. *乡村科技*, 2024, 15(1): 71-73.
- [10] 李安, 舒健虹, 刘晓霞, 等. 干旱胁迫下枯草芽孢杆菌对玉米苗期叶片的生理生化调节[J]. *西北农业学报*, 2023, 32(12): 1964-1977.
- [11] 毛腾霄, 叶华智, 秦玉花, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-8D 防治玉米纹枯病的田间试验效果及作用机理[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(20): 5252-5255.
- [12] 夏青, 刘子豪, 张晶清, 等. 强还原处理配施枯草芽孢杆菌对百合土壤酚酸的影响[J]. *土壤*, 2023, 55(5): 1016-1024.
- [13] 刘王叶, 卢娇娇, 史伟杰. 枯草芽孢杆菌与酵素菌对马铃薯根际土壤微生物的影响[J]. *中国农学通报*, 2023, 39(31): 122-128.
- [14] 胡金雪, 樊建英, 相丛超. 枯草芽孢杆菌对马铃薯的促生防病效应[J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(10): 121-128.
- [15] 张明, 李明, 杨龙伟, 等. 生物有机肥配施枯草芽孢杆菌对穿心莲品质及土壤性质的影响[J]. *山东农业科学*, 2023, 55(8): 101-109.
- [16] 孙永, 米宏彬, 石超. 不同微生物菌剂及品种对大白菜根肿病防治及土壤养分的影响[J]. *陕西农业科学*, 2023, 69(7): 88-92.
- [17] 刘鹏, 刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. *农学学报*, 2013, 3(3): 26-31.
- [18] DAZA A, SANTAMARIA C, RODRIGUEZ-NAVARRO DN, et al. Perlite as a carrier for bacterial inoculants[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(4): 567-572.
- [19] 牛彦波, 吴皓琼, 李智载. 灭菌方式及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, 15(3): 36-39.
- [20] 范丙全. 我国生物肥料研究与应用进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(6): 1602-1613.
- [21] ZHAO Q Y, DONG C X, YANG X M, et al. Bio-control of *Fusarium* wilt disease for curcuma's melon using bio-organic fertilizer[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 47(1): 67-75.
- [22] 王卓, 郭全恩, 展宗冰, 等. 有机肥料总氮含量的测定方法研究[J]. *寒旱农业科学*, 2023, 2(4): 360-364.
- [23] 王晓媛, 孙娇. 有机肥替代氮肥对银北灌区盐化灌淤土理化性质及玉米生长的影响[J]. *寒旱农业科学*, 2024, 3(1): 51-56.
- [24] OKUR N. A review: bio-fertilizers-power of beneficial microorganisms in soils[J]. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2018, 4(4): 4028-4029.
- [25] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生物肥料的研究进展及在桑树上的应用[J]. *中国蚕业*, 2018, 39(2): 42-46.
- [26] 马常宝, 史梦雅. 我国微生物肥料产业发展状况[J]. *中国农技推广*, 2016, 32(2): 13-18.
- [27] 韩秀芳, 高勇, 谢宏昌, 等. 黑龙江省生物肥料的发展现状及趋势[J]. *农机使用与维修*, 2010(1): 112-114.
- [28] 姜美怡. 生物肥的昨天、今天、明天[J]. *农村·农业·农民(B版)*, 2015(10): 26-27.
- [29] 元文霞, 毕影东, 樊超, 等. 我国生物肥料的发展现状与应用[J]. *农业科技通讯*, 2022(12): 4-9.
- [30] 王玉丽. 腐熟用枯草芽孢杆菌菌剂的研制[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.