



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110041139 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201910461448.6

C05F 17/00(2006.01)

(22)申请日 2019.05.30

(83)生物保藏信息

CGMCC No. 15325 2018.01.29

(71)申请人 沈阳农业大学

地址 110866 辽宁省沈阳市沈河区东陵路  
120号

(72)发明人 高增贵 姚远 刘限 董辉

孙艳秋 李兴海

(74)专利代理机构 沈阳科威专利代理有限责任

公司 21101

代理人 张述学

(51)Int.Cl.

C05G 3/00(2006.01)

C05G 3/04(2006.01)

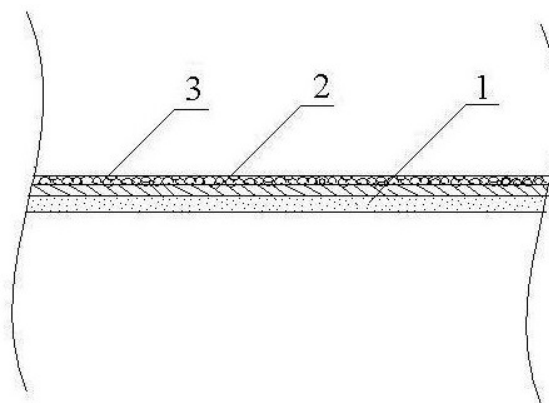
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂  
及使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法,所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂从下至上依次设有可降解基质层、胶层、载体和生物菌混合层;所述可降解基质层为可降解纸,所述胶层为具微量元素的淀粉胶粘剂层,所述载体和生物菌混合层中,所述载体原料组分按重量比例包括如下,稻壳炭90-100,草木灰0-10;所述生物菌为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzae*),使用方法为耕作前连作土壤修复和穴施两种,本发明的生物菌多层带剂可以简化施用操作步骤,扩大栖稻假单胞菌对连作土壤的修复面积,延长栖稻假单胞菌的有效期,易于保存。



1. 一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂,其特征是:所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂从下至上依次设有可降解基质层、胶层、载体和生物菌混合层;所述可降解基质层为可降解纸,所述胶层为具微量元素淀粉胶粘剂层,所述载体和生物菌混合层中,所述载体原料组分按重量比例包括如下,稻壳炭90-100,草木灰0-10;所述生物菌为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*),保藏单位: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,保藏编号为CGMCC No. 15325,保藏日期为2018年01月29日,分类命名为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*);

所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂的制备方法包括以下步骤:

(1) 制作具微量元素淀粉胶粘剂

所述具微量元素淀粉胶粘剂原料组分按重量比例包括如下:淀粉15-30,冷水60-85,过氧化氢(30%)0.5-1.5,硫酸亚铁0.3-0.5,硫酸镁0.01-0.015,氢氧化钠0.5-1.5,硫酸钙1-1.5,硫酸锰0.04-0.06,硫酸锌0.04-0.05,四硼酸钠0.3-0.5;

所述淀粉为玉米淀粉、土豆淀粉、红薯淀粉中任一种;

淀粉胶粘剂制作方法如下:

①配制过氧化氢,硫酸亚铁,硫酸镁,氢氧化钠,硫酸钙,硫酸锰,硫酸锌,四硼酸钠溶液;

②冷水和淀粉充分搅拌均匀,使其成为淀粉溶液;

③按顺序:过氧化氢溶液、氢氧化钠溶液、硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸钙、硫酸锰、硫酸锌依次倒入淀粉溶液中,充分搅拌;

④用加热夹层水溶锅将③得到的溶液升温至40℃~60℃,停止加热;

⑤糊化反应20-30分钟后,加入四硼酸钠溶液,得到淀粉胶粘剂;

(2) 涂胶

平铺可降解纸,用具微量元素淀粉胶粘剂涂布,形成胶层;

(3) 制作载体层

将稻壳炭粉碎,粒径为0.5-1.5mm,按重量比与草木灰混合后,均匀铺满胶层上方,并用滚筒或压板将载体层在胶层上压牢,在无菌条件下干燥;

(4) 制备生物菌剂

所述生物菌剂为栖稻假单胞菌的发酵液,所述栖稻假单胞菌的发酵液配制方法为胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠(NaCl)10g/L,琼脂2-8 g/L接种量为培养基重量的2%,发酵温度为28℃,搅拌速度为120rpm,发酵时间为5天,得到带有粘性的菌悬液,用上述发酵液培养基将菌悬液浓度调至 $5.0-8.0 \times 10^8$ cfu/ml;

(5) 负载生物菌

将菌悬液均匀喷洒在步骤(3)的载体层上,用薄膜覆盖表面,负载生物菌后的多层带剂在温度为25-28℃,密闭放置10日-180日可用。

2. 根际权利要求1所述的一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂,其特征是所述用于连作土壤修复的生物菌多层带剂使用方法,包括以下方法:

(1) 耕作前连作土壤修复:在作物栽培前的整地期间,将所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂埋于翻耕后土表下20-30cm处,土壤湿度控制在含水量40-65%,处理期为40d-

90d,其后可正常进行作物栽培;

(2)穴施:在作物移栽时,剪取移植穴面积相匹配的多层带剂,在移植幼苗前放入穴底,保证多层带剂与根的距离在2-5cm,再正常进行移植即可。

## 一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物肥和土壤修复领域,具体是涉及一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法。

### 背景技术

[0002] 设施农业是目前我国基础农业生产方式之一,为保证人民在有限的土地资源下满足生活需要起到了重要的作用。然而设施农业由于连茬种植某一品种,导致土壤理化性质下降,土壤病原微生物大量繁殖,作物根系分泌物中的自毒物质累积,进而影响了作物的正常生长,连作障碍症状明显。

[0003] 土壤修复是目前解决连作障碍的有效方法之一,目前连作障碍的修复大多采用化学药剂和生物菌进行治理。化学药剂如棉隆熏蒸处理黄瓜、瓜类作物大棚土壤,后茬黄瓜或瓜类作物枯萎病发病率显著降低,但化学药剂对土壤中酚酸物质并没有降解作用,而且会加重土壤理化性质恶化。生物菌用于治理设施连作土壤也有了很大的发展,但由于生物菌对周围环境要求较高,利用率较低,尤其是目前的使用方法无法使生物菌长久保持活性,导致生物菌修复连作土壤在实际生产中无法得到广泛应用。

[0004] 栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*)是一种作物根际自毒物质降解菌,通过在土壤中定植可以降低土壤中自毒物质的含量,提高作物生长。专利号201810303948.2公开了该菌的作用和使用方法,通过制备该菌菌剂,在瓜类作物的移栽期采用穴施和灌根的施用,其有益效果是菌液灌根的方法可以对移植作物植株根系土壤进行有效修复。但由于该细菌发酵后最佳使用时间为5-7天,菌液制备必须在定植前做好前期工作,而且灌根在定植过程中操作比较繁琐,应用面积也有限,即菌剂的制备和使用方法限制了栖稻假单胞菌在连作土壤修复上的应用。

### 发明内容

[0005] 为了弥补上述现有技术的不足,本发明提出了一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法,可以简化施用操作步骤,扩大栖稻假单胞菌对连作土壤的修复面积,提高土壤酚酸降解率,延长栖稻假单胞菌的有效期,易于保存。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的,一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法,其技术要点是:所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂从下至上依次设有可降解基质层、胶层、载体和生物菌混合层;所述可降解基质层为可降解纸,所述胶层为具微量元素的淀粉胶粘剂层,所述载体和生物菌混合层中,所述载体原料组分按重量比例包括如下,稻壳炭90-100,草木灰0-10;所述生物菌为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*),保藏单位: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,保藏编号为CGMCC No. 15325,保藏日期为2018年01月29日,分类命名为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*);

所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂的制作方法包括以下步骤:

### (1) 制作具微量元素淀粉胶粘剂

所述具微量元素淀粉胶粘剂原料组分按重量比例包括如下：淀粉15-30，冷水60-85，过氧化氢(30%)0.5-1.5，硫酸亚铁0.3-0.5，硫酸镁0.01-0.015，氢氧化钠0.5-1.5，硫酸钙1-1.5，硫酸锰0.04-0.06，硫酸锌0.04-0.05，四硼酸钠0.3-0.5；

所述淀粉为玉米淀粉、土豆淀粉、红薯淀粉中任一种；

淀粉胶粘剂制作方法如下：

①配制过氧化氢，硫酸亚铁，硫酸镁，氢氧化钠，硫酸钙，硫酸锰，硫酸锌，四硼酸钠溶液；

②冷水和淀粉充分搅拌均匀，使其成为淀粉溶液；

③按顺序：过氧化氢溶液、氢氧化钠溶液、硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸钙、硫酸锰、硫酸锌依次倒入淀粉溶液中，充分搅拌；

④用加热夹层水溶锅将③得到的溶液升温至40℃-60℃，停止加热；

⑤糊化反应20-30分钟后，加入四硼酸钠溶液，得到淀粉胶粘剂；

### (2) 涂胶

平铺可降解纸，用具微量元素淀粉胶粘剂涂布，形成胶层；

### (3) 制作载体层

将稻壳炭粉碎，粒径为0.5-1.5mm，按重量比与草木灰混合后，均匀铺满胶层上方，并用滚筒或压板将载体层在胶层上压牢，在无菌条件下干燥；

### (4) 制备生物菌剂

所述生物菌剂为栖稻假单胞菌的发酵液，所述栖稻假单胞菌的发酵液配制方法为胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠(NaCl)10g/L，琼脂2-8 g/L接种量为培养基重量的2%，发酵温度为28℃，搅拌速度为120rpm，发酵时间为5天，得到带有粘性的菌悬液，用上述发酵液培养基将菌悬液浓度调至 $5.0-8.0 \times 10^8$ cfu/ml；

### (5) 负载生物菌

将菌悬液均匀喷洒在步骤(3)的载体层上，用薄膜覆盖，负载生物菌后的多层带剂在温度为25-28℃，密闭放置10日-180日可用。

[0007] 本发明还提供了用于修复连作土壤的生物菌多层带剂使用方法，包括以下方法：

(1) 耕作前连作土壤修复：在作物栽培前的整地期间，将所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂埋于翻耕后土表下20-30cm处，土壤湿度控制在含水量40-65%，处理期为40d-90d，其后可正常进行作物栽培；

(2) 穴施：在作物移栽时，剪取移植穴面积相匹配的多层带剂，在移植幼苗前放入穴底，保证多层带剂与根的距离在2-5cm，再正常进行移植即可。

[0008] 本发明的有益效果：

(1) 延长了栖稻假单胞菌的活性有效期，现有技术中栖稻假单胞菌的发酵液中活性菌有效期相对较短，长期存放会导致失活，因此，必须在种植作物前制备，对菌剂的制作和使用时间的要求较高。本发明的多层带剂负载栖稻假单胞菌后为其提供繁殖所需营养，可以延长该菌的有效期。

[0009] (2) 使用操作更加简化，本发明的多层带剂的使用方法包括直接入土(耕作前连作土壤修复)和定植入土(穴施)，多层带剂直接入土后分解，提高土壤养分并同时降低连作土

壤的酚酸物质;定植入土可以降低连作土壤中酚酸物质对根系的伤害,同时改良移植作物根系的土壤微环境,进而提高移植作物的存活率。

### 附图说明

[0010] 图1为所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂的结构示意图。

[0011] 图中各结构的具体名称为:可降解基质层1,胶层2,载体和生物菌混合层3。

### 具体实施方式

[0012] 一种用于连作土壤修复的生物菌多层带剂及使用方法,所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂从下至上依次设有可降解基质层、胶层、载体和生物菌混合层;所述可降解基质层为可降解纸,所述胶层为具微量元素淀粉胶粘剂层,所述载体和生物菌混合层中,所述载体原料组分按重量比例包括如下,稻壳炭90,草木灰10;所述生物菌为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzae*),保藏单位: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,保藏编号为CGMCC No. 15325,保藏日期为2018年01月29日,分类命名为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzae*);

所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂的制作方法包括以下步骤:

#### (1) 制作具微量元素淀粉胶粘剂

所述具微量元素淀粉胶粘剂原料组分按重量比例包括如下:玉米淀粉30,冷水80,过氧化氢溶液(30%)1.3,硫酸亚铁0.3,硫酸镁0.012,氢氧化钠1,硫酸钙1.2,硫酸锰0.05,硫酸锌0.05,四硼酸钠0.5;

淀粉胶粘剂制作方法如下:

①配制硫酸亚铁,硫酸镁,氢氧化钠,硫酸钙,硫酸锰,硫酸锌,四硼酸钠溶液;

②冷水和淀粉充分搅拌均匀,使其成为淀粉溶液;

③按顺序:过氧化氢溶液、氢氧化钠溶液、硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸钙、硫酸锰、硫酸锌依次倒入淀粉溶液中,充分搅拌;

④用加热夹层水溶锅将③得到的溶液升温至40℃-60℃,停止加热;

⑤糊化反应20-30分钟后,加入四硼酸钠溶液,完成淀粉胶粘剂制作;

#### (2) 涂胶

平铺可降解纸,用具微量元素淀粉胶粘剂涂布,形成胶层;

#### (3) 制作载体层

将稻壳炭粉碎,粒径为0.5-1.5mm,按重量比与草木灰混合后,均匀铺满胶层上方,并用滚筒或压板将载体层在胶层上压牢,在无菌操作台上吹风干燥;

#### (4) 制备生物菌剂

所述生物菌剂为栖稻假单胞菌的发酵液,所述栖稻假单胞菌的发酵液配制方法为胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠(NaCl)10g/L,琼脂4-8 g/L接种量为培养基重量的2%,发酵温度为28℃,搅拌速度为120rpm,发酵时间为5天,得到带有粘性的菌悬液,用上述发酵液培养基将菌悬液浓度调至 $7.5 \times 10^8$ cfu/ml;

#### (5) 负载生物菌

将菌悬液均匀喷洒在步骤(3)的载体层上,用薄膜覆盖,负载生物菌后的多层带剂在温度为25-28℃,密闭放置10日后即可应用。

[0013] 用于修复连作土壤的生物菌多层带剂的修复效果田间试验:

(1) 试验时间2018年3月中旬-2018年5月。

[0014] (2) 试验地点为沈阳农业大学田间试验基地甜瓜温室,其中甜瓜连作3年,上茬作物,甜瓜。

[0015] (3) 试验方法

①用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对连作作物植株成活率的影响试验方法:处理1:耕作前连作土壤修复:在作物栽培前的整地期间,将所述用于修复连作土壤的生物菌多层带剂埋于上茬种植台土表下20cm处,土壤湿度控制在含水量50%,处理期为45 d,5月初正常移植甜瓜幼苗;处理2:穴施:5月初在甜瓜幼苗移栽时,剪取移植穴面积相当的多层带剂,在移植幼苗前放入穴底,保证多层带剂与根的距离2-5cm,再正常进行移植即可;处理3:不做上述处理的对照。

[0016] ②用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对土壤中的酚酸物质的降解作用检测方法:

取处理1、处理2植株根际土壤25 g,将供试土壤置于75 mL的离心管中,向土壤中添加25 mL的1 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH溶液,用漩涡震荡仪混匀后静置24 h,次日常翻转摇匀仪混匀1 h,超声波振荡器震荡30 min,离心后分离上清液,采用12 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸调整土壤溶液pH值到2.5,静置2 h后离心除去胡敏酸,分离上清液4℃保存准备分析测定。

[0017] 酚酸类物质 HPLC 分离和鉴定方法、HPLC法色谱条件、土壤中不同种类的酚酸的测定采用和数据处理及统计分析方法见专利号201810303948.2中段0030-0037。

[0018] (4) 6月中旬调查移植甜瓜植株成活率。

[0019] 植株成活率计算方法:植株成活率=存活植株总数/调查总数×100%

用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对连作作物植株成活率的影响结果见表1,结果表明,与对照相比,采用生物菌多层带剂处理的甜瓜成活率明显提高。

[0020] 表1 用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对连作作物植株成活率的影响

处理	甜瓜成活率
处理1	88.24%
处理2	92.25%
对照	52.10%

(5) 用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对土壤中的酚酸物质的降解作用结果

用于修复连作土壤的生物菌多层带剂对甜瓜连作土壤中的酚酸物质的降解作用结果表明,两种使用方法均对甜瓜分泌物中的主要酚酸具有优异的降解作用(见表1),其中对对羟基苯甲酸、香草醛、香兰素、香豆酸、苯甲酸、肉桂酸的降解作用均达到50%以上,表现出优异的降解作用。

[0021] 从降解效果可以看出,处理1与处理2对所测试酚酸的降解率相当,处理1多层带剂比处理2早施用45d,但效果与处理2相当,说明该多层带剂有效期长,适于连作土壤治理。

[0022] 表1 微生物菌剂对甜瓜连作土壤中的酚酸物质的降解作用

土壤中自毒物质	处理1降解率	处理2降解率
---------	--------	--------

对羟基苯甲酸	51.25%	55.31%
香草醛	62.10%	65.18%
丁香酸	45.38%	44.22%
香兰素	49.07%	51.37%
香豆酸	55.89%	54.16%
邻苯二甲酸二丁酯	42.68%	48.71%
苯甲酸	58.64%	60.28%
肉桂酸	71.12%	72.52%

发明原理:

现有技术表明栖稻假单胞菌对土壤酚酸具有降解作用,本发明设置了可降解纸、淀粉胶粘剂、稻壳炭和草木灰混合物三层载体层作为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*)发酵液的基质,带有粘性的栖稻假单胞菌发酵液经过薄膜覆盖后逐渐渗入稻壳炭中,在稻壳炭孔隙中形成团聚体,进而吸附和负载于稻壳炭中,稻壳炭为炭化稻壳,其孔隙度和营养适宜栖稻假单胞菌生长繁殖。

[0023] 生物菌多层带剂进入土壤后,可降解纸、淀粉胶粘剂、稻壳炭延缓了栖稻假单胞菌的在土壤中释放的速度,减少了释放后的损失,胶层中淀粉颗粒和可降解纸被土壤中微生物侵蚀分解,淀粉胶层和可降解纸在土壤中分解后,为栖稻假单胞菌提供养分促使其繁殖,淀粉胶层中的微量元素逐渐溶解于土壤中,提高作物根际土壤的养分。本发明采用的可降解纸可以从市场购买,也可以为专利号201710138527.4,或201510744895.4中的制备方法制备得到。



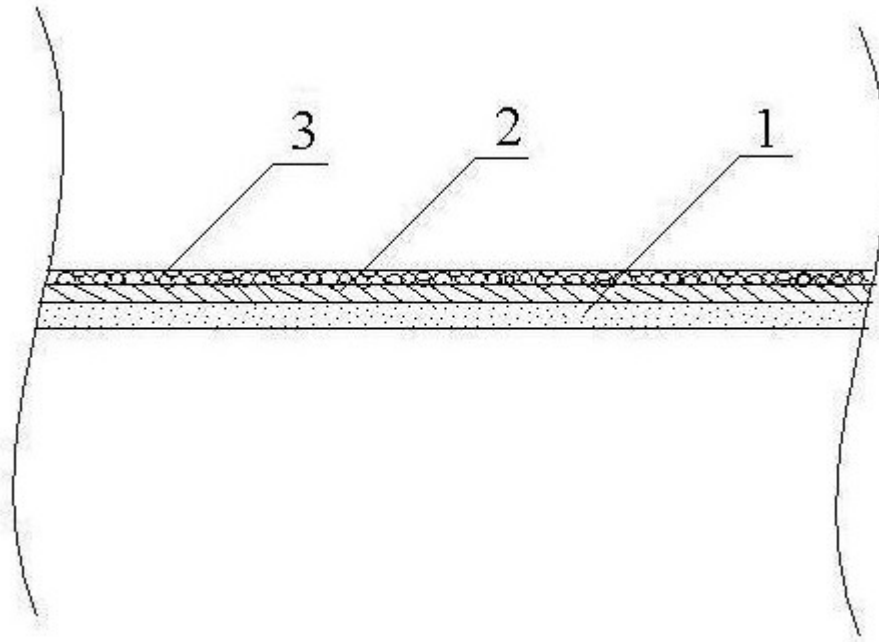


图1