

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C09K 17/14
C12S 13/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510018149.3

[43] 公开日 2005年8月17日

[11] 公开号 CN 1654596A

[22] 申请日 2005.1.13

[21] 申请号 200510018149.3

[71] 申请人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 毕永红 胡征宇

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

[54] 发明名称 土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法

[57] 摘要

本发明公开了一种土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法，步骤是：1. 藻种的分离、纯化，从土壤结皮中分离藻类，进行固体平板培养并使之纯化；2. 藻种的培养、筛选和保存，将藻接种到液体中通气培养；选择有实用价值的藻种，离心收集，干燥保存；3. 对干燥藻种复水，恢复活性后扩大培养；4. 适应性锻炼，模拟野外条件，使藻种适应多变环境；5. 野外接种、培养，将藻接种到荒漠半荒漠土壤中，采用地膜覆盖、定时喷洒培养液等进行培养；6. 管理。本发明通过藻类在地表的生长繁殖及其细胞分泌物提高土壤有机质含量，增加土壤含水量和促进结构稳定，从而有效改善土壤的理化及生物性状。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法，它包括下列步骤：

A、藻种的分离、纯化：首先是采集荒漠半荒漠地区的微生物结皮，每克土壤使用 20mL 的无菌水浸泡 12-24 小时，浸泡过程中搅拌 12-24 次得到土壤悬液，土壤悬液按 10^{-1} 到 10^{-8} 稀释，无菌滴管吸取水溶液接种到固体平板上，每一平皿滴加土壤悬液 0.04-0.06mL 进行培养，21-28 天后得到藻落；其次是在无菌培养液中清洗 3-4 次，接种到琼脂平板培养皿中进行单独培养，单独培养的藻种，8-10 次重复平板划线接种培养获得纯化培养的单藻落；

B、藻种的培养、筛选和保存：首先是将通过分离纯化步骤获得的藻种接种到液体培养基中，在光照 $30-60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和温度 $20-28^{\circ}\text{C}$ 条件下通气培养；其次是通过实验室培养和生理试验比较其生长速率、不同藻种对环境的抗性，同时研究不同藻种的胞外分泌物，并通过室内和室外荒漠半荒漠土壤表面的藻类接种培养试验，选择生长速率快、抗逆能力强、胞外物质分泌多的藻种；第三是将筛选的抗性性状、生长速率快的藻种培养 18-28 天后，离心收集藻泥，阴干后干燥保存；

C、藻种的复水和扩大培养，在 $30-60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 $18-28^{\circ}\text{C}$ 下对干燥保存的藻种进行复水，恢复其生理活性，并使用气升式生物反应器进行藻种的扩大培养，在 28-32 天内获得野外接种所需要的生物量；

D、环境适应性锻炼，在室内模拟野外环境，使培养的藻类逐步适应变动的环境条件，关闭反应器的温度控制部分，使藻种适应温度的变化；模拟野外光强的变化，从早上开始逐步增加光强，到中午达到光强，随后光强下降，到晚上降低到 $0 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ；

E、野外接种、培养，将室内培养得到的藻类接种到荒漠半荒漠土壤中，采用地膜覆盖、定时喷洒 BG11、HGZ 或 BBM 培养液进行野外培养；

F、管理工作，安排专人对接种藻类的区域进行监测和看护，保证定时喷施培养液，接种初期保证不低于 18°C 和 $25 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，此外还要防止人畜外力的破坏作用。

2. 根据权利要求 1 所述的一种土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法，其特征的野外接种培养步骤如下：

a、圈围接种场地，防止人畜的干扰；

b、每平方米喷洒 1-3L 水使接种场地表面保持湿润，接种所选的藻种到荒漠半荒漠土壤上；

c、将接种场地用地膜覆盖，每天上午 8:00-9:00 揭开地膜，下午 3:30-4:30 压膜；

d、每天上午 9:00-10:00 使用喷雾器每平方米喷洒 1-3L 的 BG11、HGZ 或 BBM 培养液;

e、接种初期不低于 18°C 和 $25 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 以利于藻种在土壤表层的附着和生长。

土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法

技术领域

本发明涉及土壤改良领域，更具体涉及一种土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法。

背景技术

荒漠化是一个全球性的环境问题，其扩展趋势已经严重威胁到人类社会的可持续发展。目前，地球上受到荒漠化影响的土地面积有 3800 万 km^2 ，占陆地面积的 1/4。近些年来，全世界每年约有 600 万 hm^2 的土地发生沙漠化且有不断扩展的趋势，而我国是荒漠化危害较为严重的国家之一；据第二次全国荒漠化监测，我国荒漠化面积已达 267.4 万 km^2 ，且以每年以 1.04 万 km^2 的速度扩展。日趋严重的荒漠化不仅对西部地区经济、社会发展及人们的生存环境造成了严重威胁，而且成为我国全面建设小康社会的奋斗目标和全面改善全国生态状况的重要障碍；荒漠化带来的恶劣生态环境条件已给我国的经济和社会发展带来严重影响。

近些年来针对日益恶化的土地退化问题，人们开始利用新的科学技术寻找荒漠半荒漠土壤的改良方法，其中生物技术是目前土壤改良和荒漠化防治中应用较多的技术。它主要是通过建立人工植被，保护和恢复天然植被，最终达到防止土壤沙化，治理和开发利用荒漠化土地的目的。应该承认结合生物学的综合治理是土壤荒漠化防治的根本途径，但目前这一领域仅仅局限于高等耐旱植物的引种驯化，优化选择和合理配置防护林等方面，着眼点主要集中在防治沙尘暴上，忽视了对土壤的改良，而对于荒漠化防治而言，改良土壤才是关键的问题。只有有效地改善了荒漠半荒漠土壤的结构和理化性状，改变了土壤的生物微环境，才能够遏制土壤沙化，最终防止沙尘暴的发生，同时改良的土壤还可以恢复生产力。由于荒漠生态系统的脆弱性，目前在荒漠半荒漠土壤改良方面成功的案例尚不多见，主要的改良方法包括物理、化学和生物方法，目前集中于土壤改良剂的研制开发、耐旱植物的引种驯化和基因改良、荒漠水分的有效利用和管理等方面；但这些技术方法在实际应用中都存在不同程度的困难和弱点。

土壤藻类是以土壤为生境的藻类集群，是土壤微生物中唯一具有光合自养能力的有机物质制造者，在它们的生命过程中，通过其自身的生理活动及其对其他生物的作用，对于土壤形成和土壤肥力的提高，产生直接和间接的影响，土壤藻

是土壤生物的先行者和土壤中的生物催化剂，它参与土壤的发生、发育及与有效肥力形成有关的许多生物化学过程，对土壤的形成和熟化都起着重要作用，在土壤改良中具有实际应用潜力。利用藻类改良土壤在理论上是可行的，本发明则提供了一条具有可操作性的、切实有效的途径。

发明内容

本发明的目的是在于提供一种土壤藻类对荒漠半荒漠土壤的改良方法，以期在荒漠生态系统干旱缺水的环境中，利用尽量少的水分来培植土壤微生物结皮，达到提高土壤团聚体大小和增加团聚体数目，增加土壤含水量，丰富有机质含量，最终改善土壤理化性状，提高土壤生产力。该方法简单易行，操作方便，能够有效改良荒漠半荒漠土壤和防治沙尘暴。

为了达到上述目的，本发明采取了以下技术措施：

1、藻种的分离、纯化：采集荒漠半荒漠地区的微生物结皮，每克土壤使用20mL的无菌水浸泡12-24小时，浸泡过程中搅拌12-24次得到土壤悬液（土壤颗粒悬浮在水中形成的悬浊液）；土壤悬液按 10^{-1} 到 10^{-8} 稀释，无菌滴管吸取水溶液接种到含朱氏10号培养基的固体平板上，每一平皿滴加土壤悬液0.04-0.06mL进行培养，21-28天后可以得到15种左右的藻落，主要是蓝藻、绿藻和硅藻；用接种针挑出不同藻体，显微镜下观察鉴定；并在无菌朱氏10号培养液中清洗3-4次，接种到琼脂平板培养皿中进行单独培养；单独培养的藻种，8-10次重复平板划线接种培养可获得纯化培养的单藻落；

2、藻种的培养、筛选和保存：将通过分离纯化步骤获得的藻种接种到液体培养基中，在光照 $30-60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和温度 $20-28^\circ \text{C}$ 条件下通气培养；不同种类藻类使用不同培养液，蓝藻如微鞘藻、颤藻、席藻、鱼腥藻、念珠藻等使用BG11和HGZ培养液，绿藻如绿球藻、原球藻、小球藻等使用BBM或朱氏培养液。通过实验室培养和生理试验比较其生长速率、不同藻种对环境的抗性，同时研究不同藻种的胞外分泌物，并通过室内和室外荒漠半荒漠土壤表面的藻类接种培养试验，选择生长速率快、抗逆能力强、胞外物质分泌多的藻种；将筛选的具有优良抗性性状、生长速率快的藻种培养18-28天左右后，离心收集藻泥，阴干后干燥保存。

3、藻种的复水和扩大培养，在 $30-60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 $20-28^\circ \text{C}$ 下对干燥保存的藻种进行复水，恢复其生理活性，并使用气升式生物反应器进行藻种的扩大培养，在28-32天内可以获得野外接种所需要的生物量；

4、环境适应性锻炼，在室内模拟野外环境，使大量培养的藻类逐步适应变动的环境条件，关闭反应器的温度控制部分，使藻种适应温度的变化；模拟野外光强的变化，从早上开始逐步增加光强，到中午达到最大光强，随后光强缓慢下

降，到晚上降低到 $0 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ；

5、野外接种、培养，将室内培养得到的藻类接种到荒漠半荒漠土壤中，采用地膜覆盖、定时喷洒 BG11、HGZ 或 BBM 培养液等方法进行野外培养；包括以下步骤：a、圈围接种场地，防止人畜的干扰；b、每平方米喷洒 1-3L 水使接种场地表面保持湿润，接种所选的藻种到荒漠半荒漠土壤上；c、将接种场地用地膜覆盖，每天上午 8:00-9:00 揭开地膜，下午 3:30-4:30 压膜。d、每天上午 9:00-10:00 左右使用喷雾器每平方米喷洒 1-3L 培养液，保证地表一定的湿度以利于藻类的生长；e、接种初期需要接种初期保证温度不低于 18°C 和光照不低于 $25 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，以利于藻种在土壤表层的附着和生长。

6、管理工作，主要是对接种藻类的区域进行监测和看护，此外还要防止人畜外力的破坏作用。

本发明具有以下优点和效果：设备简单，操作方便，安全性好，不存在对环境的危害；成本低廉，需水量大大少于植树造林和种草；通过土壤藻类在地表的不断生长繁殖及藻类在生命活动过程中分泌的有机物质有效地改善荒漠半荒漠土壤的理化性状，提高土壤有机质含量，增加土壤的含水量，促进土壤结构的稳定性；此外这种对土壤的改良效应具有长期性、稳定性。

附图说明

图1为接种念珠藻120天的结皮土壤与没有接种藻类的对照土壤团聚体颗粒在三种水力处理下的级配情况。

具体实施方式

实施例：

土壤藻类对荒漠半荒漠土壤改良方法的具体步骤：

A、藻种的分离、纯化：采集内蒙古四子王旗半荒漠地区的微生物结皮，每克土壤使用 20mL 的无菌水浸泡 12-24 小时，浸泡过程中搅拌 12-24 次；土壤悬液按 10^{-1} 到 10^{-8} 稀释，无菌滴管吸取水溶液接种到固体平板上，每一平皿滴加土壤悬液 0.04mL 进行培养，21 天左右得到多种藻落，主要含颤藻、微鞘藻、念珠藻、单歧藻、绿球藻、小球藻、原球藻；将以上分离的藻种，用无菌接种针或解剖针挑出，在无菌培养液中清洗 3-4 次，接种到琼脂平板培养皿中进行培养；将该步骤重复操作 8-10 次可以获得纯化培养的单藻落；

B、藻种的培养、筛选和保存：通过以上分离纯化步骤获得了微鞘藻、念珠藻、单歧藻和小球藻四个藻种的纯培养物，将它们分别接种到液体培养基中，在光照 $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和温度 20°C 条件下通气培养；通过实验室培养试验在相同培养条件下（ $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 20°C ）比较其生长速率；通过设置变动的环境条件

(类似荒漠半荒漠地区春季的温度光照昼夜变动情况), 乃至逆境条件(高温 45 °C, 低温 -20 °C, 高光 $2000 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和渗透胁迫)比较不同藻种对环境的抗性, 同时研究不同藻种的胞外分泌物, 并通过室内和室外荒漠半荒漠土壤表面的藻类接种培养试验, 选择生长速率快、抗逆能力强、胞外物质分泌多的藻种; 通过比较发现念珠藻和微鞘藻具有优良抗性性状、生长速率快, 将它们培养 20 天后, 离心收集藻泥, 室温 20 °C 阴干后在干燥条件下保存。

C、藻种的复水和扩大培养, 在 $40 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 20 °C 条件下对干燥保存的念珠藻和微鞘藻藻种进行复水, 恢复其生理活性, 并使用气升式光生物反应器进行藻类的扩大培养, 在短时间内可以获得大量的生物量;

D、环境适应性锻炼, 在室内模拟野外温度和光照条件, 使大量培养的藻类逐步适应野外温度光照的昼夜变化;

E、野外接种、培养, 将室内培养得到的藻类接种到荒漠半荒漠土壤中, 采用地膜覆盖、定时喷洒培养液等方法进行野外培养; 包括以下步骤: a、圈围接种场地, 防止人畜的干扰; b、每平方米喷洒 1-3L 水使接种场地表面保持湿润, 接种所选的藻种到荒漠半荒漠土壤上; c、将接种场地用地膜覆盖, 每天上午 9: 00 揭开地膜, 下午 4: 00 压膜。d、每天上午 10: 00 左右使用喷雾器每平方米喷洒 1-3L 培养液, 保证地表一定的湿度以利于藻类的生长; e、接种初期需要保证不低于 18 °C 和 $25 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 以利于藻种在土壤表层的附着和生长。

F、管理工作: 安排专人对接种藻类的区域进行监测和看护, 保证定时喷施培养液, 接种初期保证不低于 18 °C 和 $25 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 此外还要防止人畜等外力的破坏作用。

结果: 通过 120 天的培养, 在半荒漠土壤表面形成了一层微生物结皮, 通过试验测定了快速湿润、缓慢湿润和机械破碎三种条件下有念珠藻接种形成结皮的土壤和没有接种藻类的对照土壤的粒径级配和平均重量粒径指数(一种衡量土壤结构稳定性的指标, Le Bissonais (1996)和 Attou et al. (1998)), 结果见图 1 和表 1, 从中可以看出, 土壤藻类的存在有助于土壤的结构稳定。

表 1 三种处理下的平均重量粒径指数

土壤样品	平均重量粒径指数 Mean weight diameter (MWD, mm)			
	快速湿润	缓慢湿润	机械破坏	平均值
对照	0.631	0.427	0.281	0.446
结皮	1.005	0.885	0.951	0.948

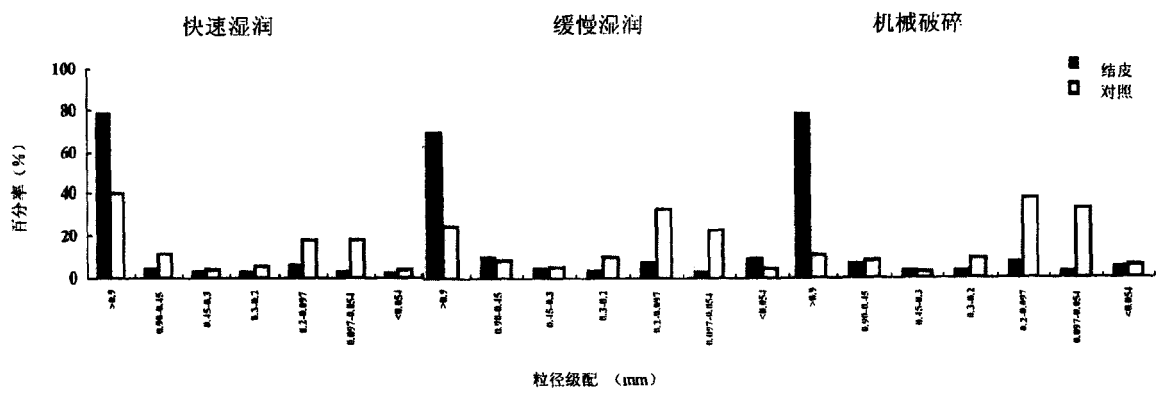


图 1