

解淀粉芽孢杆菌 L-H15 固态发酵参数优化与试验

秦宇轩¹ 王卉¹ 张志刚² 张莹¹ 尚庆茂² 李平兰¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 解淀粉芽孢杆菌是一种植物根际促生细菌。通过响应面试验和正交试验,对分离筛选得到的解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的最大活菌数进行了优化,确定了发酵工艺最佳参数。在黄瓜育苗期施用高活性固态菌剂,进行实际效果试验验证。结果表明,在优化的发酵条件下,即由 1:2.8 的麦麸和豆粕组成固态基质,外加 20% 的稻谷壳,0.2% 乳糖,0.38% 大豆蛋白胨,并用 0.4 mL/g 的液料比混合均匀;装瓶量 46%,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 活菌数高达 1.68×10^{10} CFU/g;L-H15 固态发酵菌剂能明显促进黄瓜幼苗的茎粗、株高、叶面积及生物量的累积($P < 0.05$),根系活力增强,矿质元素含量也有显著性提高。因此,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 能够有效促进植株生长,固态菌剂的研发为减少农药化肥的施用提供了技术支撑,是一种提高农作物产量的新型方法。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 促生; 发酵工艺; 固态菌剂

中图分类号: S216.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2017)05-0258-09

Solid-state Fermentation Parameter Optimization and Experiment of *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15

QIN Yuxuan¹ WANG Hui¹ ZHANG Zhigang² ZHANG Ying¹ SHANG Qingmao² LI Pinglan¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* is a kind of plant growth promoting rhizobacteria. The response surface experiment and orthogonal experiment were used to optimize the number of trophosome of *B. amyloliquefaciens* L-H15, and determine the optimal conditions of its solid-state fermentation. In addition, *B. amyloliquefaciens* L-H15 solid-state fermentation inoculant was applied to cucumber plug seedling in order to verify its actual growth-promoting. The optimized fermentation conditions were identified. The solid matrix was composed of wheat bran and soybean (1:2.8) with external 20% rice hulls, 0.2% lactose and 0.38% soy peptone. And the ratio of water to matrix was 0.4 mL/g, with 46% bottling capacity, and 5% inoculation (10^8 CFU/mL). Under this condition, the number of *B. amyloliquefaciens* L-H15 trophosome was as high as 1.68×10^{10} CFU/g. L-H15 solid-state fermentation inoculant could remarkably increase the stem diameter, height, leaf area and accumulation of biomass ($P < 0.05$), and significantly enhance the mineral elements contents. The cucumber root activity was increased by 5.86 times than that without L-H15 solid-state fermentation inoculant. Thus, *B. amyloliquefaciens* L-H15 can effectively stimulate plant growth, and L-H15 solid-state fermentation inoculant had a good prospect in the field of microbial fertilizer. This means that L-H15 is a good candidate of biofertilizer and biological control agent in the future. The application of this kind of solid fermentation inoculant can provide a new way for improving the yield of agricultural products.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; growth-promoting; fermentation process; solid-state inoculant

收稿日期: 2016-08-31 修回日期: 2016-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172001)和公益性行业(农业)科研专项(201303014)

作者简介: 秦宇轩(1989—),男,博士生,主要从事植物促生菌研究,E-mail: qinyuxuan8899@163.com

通信作者: 李平兰(1964—),女,教授,博士生导师,主要从事应用微生物研究,E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

引言

植物根际促生菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 是指生活在植物根际周围或附生于根系表面的一类可促进植物生长的有益细菌。国内外已发现 20 多个具有防病促生功能的根际微生物种属,其中芽孢杆菌属 (Bacillus) 数量最多^[1]。目前,一些芽孢杆菌菌株能够从植物根系中分离得到,对马铃薯、油菜、萝卜等农作物具有显著促生作用^[2-4]。

芽孢杆菌在生长发育后期会形成芽孢。芽孢是一种休眠体,具有抗逆、耐高温、耐酸碱、耐挤压等特性^[5]。芽孢的形成受到培养温度、pH 值和无机盐等因素的影响^[5-7]。因此,通过优化培养温度、发酵时间、无机盐成分等条件,对芽孢基因进行调控,可以提高活菌数,延长芽孢菌剂的保藏时间^[8]。我国主要利用固态发酵技术来获取高活菌数的固态菌剂。杜英^[9]采用玉米秸秆和玉米粉发酵枯草芽孢杆菌,42 h 时活菌数可达 4.64×10^{10} CFU/mL; SHIH 等^[10]利用优化的发酵条件,可使枯草芽孢杆菌产物 Iturin A 高达 11.447 mg/g。

目前,我国正面临农业发展转型,传统的化学农药虽然极大提高了农业产量和效率,但一系列环境问题也随之而来^[11]。利用微生物菌剂降低或替代化学肥料用量的新方法,可为发展绿色农业提供新途径^[12-16]。芽孢杆菌因其独特生理特性受到关注,目前市场上的微生物菌剂正在逐渐向产芽孢菌的方向发展^[17-19]。

本文对解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的固态发酵工艺进行优化,以提高固态发酵产营养体活菌数和产

孢率。将研制出的固态发酵剂进一步施用于黄瓜育苗期,通过对表观指标和理化指标的测定,验证其促生的实际效果。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株 L-H15 由中国农业大学食品科学与营养工程学院应用微生物研究室提供,分离于草炭土育苗基质。黄瓜品种为“中农 6 号”,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 黄瓜种子预处理

将黄瓜种子在 0.05 g/mL 次氯酸钠溶液中浸泡 10 min,冲洗消毒。吸水膨胀 6 h 后,放入 28℃ 催芽培养箱培养 1 d。

1.3 固态发酵活菌数优化

1.3.1 发酵条件单因素优化

选取麦麸、豆粕作为基础固态基质,对解淀粉芽孢杆菌 L-H15 进行固态发酵^[20]。共称取 50 g 粉碎后的麦麸和豆粕,加入 25 mL 的蒸馏水充分搅拌均匀,121℃ 灭菌 40 min。冷却后接入活化好的菌悬液,32℃ 培养 48 h。称取 10 g 固态发酵物,梯度稀释,用涂布法菌落计数,每个处理做 3 次重复。

分别对碳氮比、外加碳源 (葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉)、外加氮源 (大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉膏、鱼蛋白胨)、装瓶量、接种量、液料比和稻谷壳添加量进行优化,各单因素优化条件如表 1 所示。其中,由添加不同质量稻谷壳反映通气量的变化,将不添加任何外加物质作为空白对照,各因素在前一因素的最佳水平下逐级优化。

表 1 单因素优化条件
Tab.1 Single factor optimization condition

参数	数值								
碳氮比	5:1	4:1	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
外加碳源质量分数/%	0.2	0.6	1.0						
外加氮源质量分数/%	0.2	0.6	1.0						
装瓶量/%	30	40	50	60	70				
接种量/%	1	2	3	4	5				
液料比/(mL·g ⁻¹)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6				
稻谷壳添加量/%	0	1	10	15	20				

1.3.2 Plackett-Burman 试验

根据单因素试验结果,利用 Design-Expert 8.0 软件设计 Plackett-Burman 试验 (N=12),对上述 7 个因素进行考察。具体设计及响应区间如表 2 所示,响应值为解淀粉芽孢杆菌 L-H15 活菌数。通过对各因素方差、效应值和贡献率的分析,从 7 种因

素中筛选出最重要的 3 个显著因素进行下一步研究。

1.3.3 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验所得到的显著因素及效应值,设计最陡爬坡试验的方向和步长。显著因素的正负效应值分别表现为增加或减少,步长根

据单因素的试验结果确定;非显著性因素的取值依据其在 Plackett – Burman 试验中效应值确定。最陡爬坡试验具体设计方案如表 3 所示。

表 2 Plackett – Burman 试验设计
Tab.2 Design of Plackett – Burman experiment

因素	水平	
	低	高
碳氮比	1:1	1:5
乳糖质量分数/%	0.2	0.6
大豆蛋白胨质量分数/%	0.2	0.6
装瓶量/%	40	50
接种量/%	2	5
液料比/(mL·g ⁻¹)	0.3	0.5
稻壳壳添加量/%	10	20

表 3 最陡爬坡试验设计
Tab.3 Design of the steepest grade test

试验序号	碳氮比	装瓶量/%	大豆蛋白胨质量分数/%
1	1:5	40	0.2
2	1:4	44	0.3
3	1:3	48	0.4
4	1:2	52	0.5
5	1:1	56	0.6

1.3.4 Box – Behnken 响应曲面试验

由最陡爬坡试验的拐点确定响应中心点及接近响应值区域因素的取值范围,设计 Box – Behnken 响应曲面试验。采用 Design-Expert 8.0 软件设计试验方案,以碳氮比、装瓶量、大豆蛋白胨质量分数 3 个因子为自变量,以解淀粉芽孢杆菌 L – H15 活菌数为响应值进行 17 组试验,具体方案如表 4 所示。模型对活菌数进行二次多元回归拟合,生成等高线图 and 响应曲面图,获得最优发酵参数,对该模型进行方差分析,确定其可信度,并对预测结果进行验证。

表 4 Box – Behnken 响应曲面试验设计
Tab.4 Design of Box – Behnken experiment

因素	水平	
	低	高
碳氮比	1:2	1:4
装瓶量/%	44	52
大豆蛋白胨质量分数/%	0.3	0.5

1.4 解淀粉芽孢杆菌 L – H15 固态菌剂

按照优化的发酵方案制备解淀粉芽孢杆菌 L – H15 固态发酵菌剂,将发酵好的菌剂进行干燥处理,并对产品进行包装。L – H15 固态促生菌剂按照农业行业标准 NY 227 – 94 执行。

1.5 育苗验证

1.5.1 基质制备

按照草炭、蛭石、珍珠岩体积比为 3:1:1 混合,

加入适量的水搅拌均匀,制备空白对照试验。向 1 L 基质中加入 1 袋制备好的解淀粉芽孢杆菌 L – H15 固态发酵剂(净含量 10 g),充分混合均匀。

1.5.2 形态指标测定

将黄瓜种子分别播于盛有上述处理基质的供试穴盘,每个处理组做 3 次重复。置于温室内培养,昼、夜温度控制为(28 ± 3)℃、(20 ± 3)℃,相对湿度控制为 70%。

各指标测定时间为黄瓜出苗 14 d 及 24 d。从每个重复的穴盘中随机抽取 6 株黄瓜苗,进行测定。

1.5.3 理化指标测定

1.5.3.1 植株根系活力测定

植株根系活力采用 TTC 法进行定量测定。以乙酸乙酯作为空白对照,于 485 nm 波长下测定吸光度,绘制 TTC 的标准曲线。根据 TTC 标准曲线求出四氮唑还原强度,四氮唑还原强度说明了植株根系脱氢酶的活性,即反映了植株的根系活力,其计算公式为

$$a = \frac{c}{Mt}$$

式中 a——四氮唑还原强度,mg/(g·h)
c——四氮唑还原量,mg
M——根质量,g
t——时间,h

1.5.3.2 黄瓜苗期矿物质含量测定

黄瓜幼苗的消煮采用硫酸–水杨酸–双氧水法,制备消煮液。

植株全氮含量测定:吸取 0.2 mL 消煮液,加 3 mL 水杨酸–硫酸,混合均匀,静置 2 h 后,在 660 nm 处测定吸光度。

植株全磷含量测定:吸取 2 mL 消煮液,加两滴 2,6-二硝基酚指示剂,用 6 mol/L NaOH 中和至黄色,加入 2 mL 钒钼酸铵试剂,用水定容至 10 mL,摇匀。静置 15 min,在 450 nm 处测定吸光度。

植株全钾含量测定:吸取 2 mL 消煮液,置于 30 mL 20% 硝酸钠溶液中,于 25℃、130 r/min 振荡 1 h,吸取 1 mL 滤液,加 37% 甲醛 0.5 mL、5% EDTA 0.5 mL、3% 四苯硼钠 1 mL,混合均匀,在 420 nm 处测定吸光度。

植株全镁含量测定:吸取 2 mL 消煮液,加入 5% LaCl₃ 溶液 2 mL,用去离子水定容。使用空气–C₂H₂ 火焰,在 285 nm 处测定吸光度。

1.5.3.3 育苗基质速效矿质元素测定

取黄瓜幼苗的育苗基质于 40℃ 干燥,矿质元素测定方法同 1.5.3.2 节。

2 结果与分析

2.1 各因素对固态发酵活菌数的影响

2.1.1 发酵工艺各单因素对活菌数影响

如图1所示,固态基质碳氮比对解淀粉芽孢杆菌L-H15的活菌数影响呈现先快速上升后缓慢下降的趋势,响应区间确定为碳氮比1:1~1:5。在碳氮比为1:3时,菌落数达到最大值 9.35×10^8 CFU/g。以

葡萄糖、麦芽糖和乳糖为外加碳源,可促进L-H15活菌数的增长,其中以乳糖的效果最为明显,添加0.2%的乳糖时活菌数达到最大值 1.55×10^9 CFU/g,响应区间为固态基质质量的0.2%~0.6%。大豆蛋白胨和牛肉膏作为外加氮源可以明显促进菌株生长,考虑到经济效益以及扩大生产时牛肉膏为半液体状损耗较多,因此选择大豆蛋白胨为最佳的外加氮源,响应区间为固态基质质量的0.2%~0.6%。

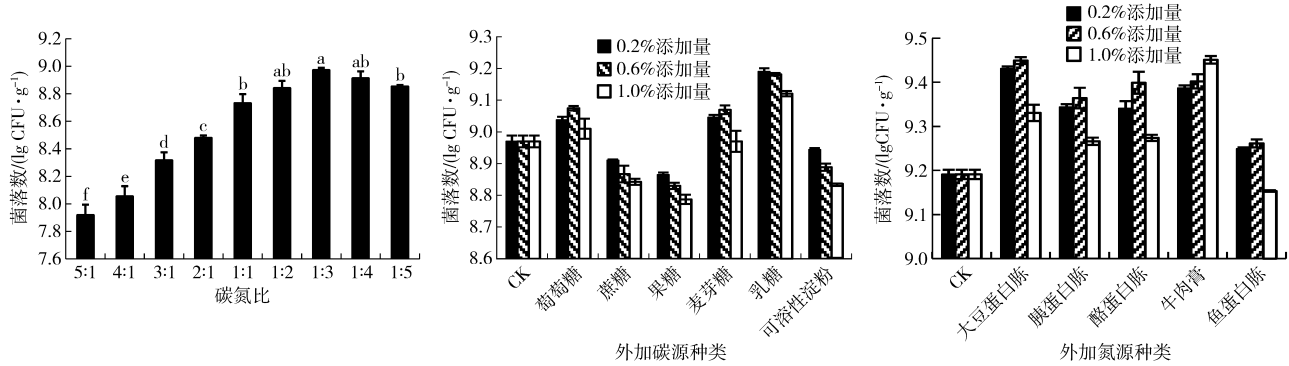


图1 碳源和氮源对固态发酵活菌数的影响

Fig.1 Influence of C/N ratio, carbon source and nitrogen source on bacterium number in solid fermentation

如图2所示,装瓶量和接种量对L-H15活菌数的影响均呈现先增大后减小的趋势。装瓶量和接种量的响应区间分别选择40%~50%和2%~5%范围内,最大活菌数分别为 3.56×10^9 CFU/g、 4.05×10^9 CFU/g。固体基质中液料比对L-H15活菌数的影响呈抛物线型,响应区间为0.3~0.5 mL/g,此时活菌数最大值达到 6.08×10^9 CFU/g;通气量参数通过添加稻谷壳来模拟,菌落数随添加量的增加快速上升最后趋于稳定,响应区间为10%~20%,此时L-H15活菌数最大可以达到 9.01×10^9 CFU/g。

2.1.2 Plackett-Burman 试验

本试验考察碳氮比、乳糖质量分数、大豆蛋白胨质量分数、装瓶量、接种量、液料比、稻谷壳添加量7个因素对固态发酵的贡献率。将响应区间取值转换为编码值-1和1,其中-1代表低水平,1代表高水平,试验设计及结果如表5所示,表中A、C、D、F、G、

H、K分别表示碳氮比、乳糖质量分数、大豆蛋白胨质量分数、装瓶量、接种量、液料比、稻谷壳添加量的编码值。

用Design-Expert 8.0对Plackett-Burman试验结果进行效应分析,结果如表6所示。

由表6看出,7个因素对模型影响的贡献率依次为:碳氮比、装瓶量、大豆蛋白胨质量分数、液料比、乳糖质量分数、稻谷壳添加量、接种量。选取贡献率最大的3组因素(碳氮比、装瓶量、大豆蛋白胨质量分数)进行部分方差分析。其显著性顺序与因素的贡献率相一致;模型方差 $P<0.05$,说明Plackett-Burman试验的结果具有可信度。因此,选择碳氮比、装瓶量、大豆蛋白胨质量分数三因素进行最陡爬坡试验。

2.1.3 最陡爬坡试验

由图3可以看出,所设计的最陡爬坡试验结果出现理想的先增高后降低的趋势,在3号试验点处

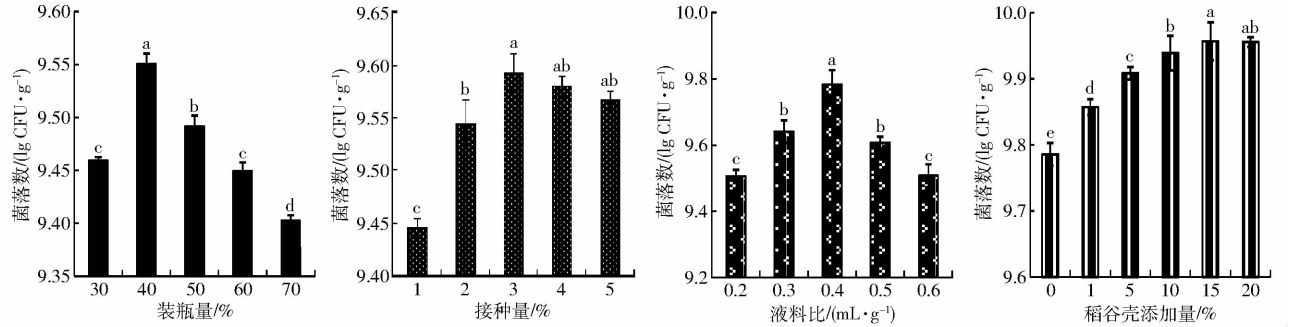


图2 发酵条件单因素优化

Fig.2 Optimization of single factor of fermentation conditions

表 5 Plackett – Burman 试验设计及结果

Tab.5 Design and results of Plackett – Burman experiment

试验序号	A	C	D	F	G	H	K	L – H15 活菌数/(lg CFU·g ⁻¹)
1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	9.989 ± 0.064
2	-1	1	1	-1	-1	1	1	9.906 ± 0.103
3	1	-1	1	1	-1	-1	1	9.841 ± 0.055
4	1	1	1	-1	-1	-1	-1	9.878 ± 0.067
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.904 ± 0.165
6	1	1	-1	-1	1	-1	1	9.843 ± 0.067
7	-1	-1	1	1	1	-1	1	9.961 ± 0.024
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	9.954 ± 0.039
9	-1	1	-1	1	-1	1	1	10.143 ± 0.095
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	9.840 ± 0.107
11	1	1	1	1	1	1	-1	9.816 ± 0.249
12	1	-1	-1	1	-1	1	-1	9.835 ± 0.028

表 6 Plackett – Burman 试验效应分析

Tab.6 Effect analysis of Plackett – Burman experiment

因素	效应	贡献率/%
碳氮比	-0.210	62.34
乳糖质量分数	0.026	1.88
大豆蛋白胨质量分数	0.094	19.27
装瓶量	0.124	28.33
接种量	-0.011	0.69
液料比	-0.042	6.81
稻谷壳添加量	-0.023	1.74

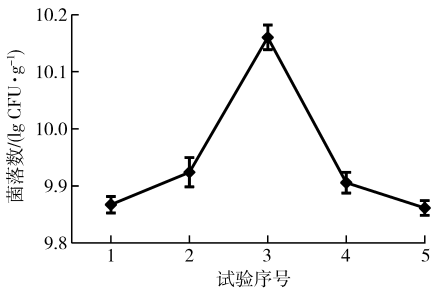


图 3 最陡爬坡试验结果

Fig.3 Result of the steepest grade test

出现最高点,即碳氮比为 1:3、装瓶量为三角瓶的 48%、大豆蛋白胨质量分数为 0.4% 时,解淀粉芽孢杆菌 L – H15 活菌数达到最大,最大值为 1.44×10^{10} CFU/g。

2.1.4 Box – Behnken 响应曲面试验

设计三水平三因素的 Box – Behnken 试验,对 Plackett – Burman 试验筛选出的显著因素进行响应面优化,以最陡爬坡试验优化出的碳氮比为 1:3、装瓶量为三角瓶的 48%、大豆蛋白胨质量分数为 0.4% 的条件为中心点进行试验。以解淀粉芽孢杆菌 L – H15 活菌数为响应值,具体试验方案及结果如表 7 所示。

表 7 Box – Behnken 试验设计及结果

Tab.7 Design and results of Box – Behnken experiment

试验序号	因素			L – H15 活菌数/ (lg CFU·g ⁻¹)
	碳氮比	装瓶量/ %	大豆蛋白胨 质量分数/%	
1	1:3	44	0.3	10.167 ± 0.400
2	1:3	52	0.3	10.207 ± 0.092
3	1:3	48	0.4	10.225 ± 0.732
4	1:3	44	0.3	10.197 ± 0.079
5	1:4	52	0.4	10.198 ± 0.335
6	1:4	44	0.4	10.186 ± 0.071
7	1:3	52	0.5	10.172 ± 0.206
8	1:4	48	0.3	10.128 ± 0.625
9	1:3	48	0.4	10.217 ± 0.737
10	1:2	52	0.4	10.143 ± 0.531
11	1:3	48	0.4	10.201 ± 0.674
12	1:2	44	0.4	10.127 ± 0.665
13	1:2	48	0.5	10.224 ± 0.595
14	1:3	48	0.4	10.241 ± 0.913
15	1:4	48	0.5	10.132 ± 0.517
16	1:3	48	0.4	10.173 ± 0.107
17	1:2	48	0.3	10.176 ± 0.142

根据 Box – Behnken 试验结果建立回归模型并进行方差分析。所选模型的 $P = 0.0027 < 0.01$,模型回归极显著,具有可信度;失拟项 $P = 0.0775 > 0.05$,失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰小,模型选择适当。

对 Box – Behnken 试验回归模型进行可信度分析,决定系数为 0.957,校正决定系数为 0.9108,信噪比大于 4,说明预测值与实测值之间具有高度的相关性,上述模型合理可用。

由图 4 可以看出,等高线图均为椭圆形,响应面

三维图均有稳定点,且为极大值。对结果进行二次多元回归拟合处理,得到固态发酵中解淀粉芽孢杆菌 L-H15 活菌数(R)对碳氮比(A)、装瓶量(F)、大豆蛋白胨质量分数(D)的二次多元回归方程为

$$R = 10.21 - 0.00534A + 0.00305F - 0.00179D - 0.0072AF - 0.0115AD + 0.0016DF - 0.0341A^2 - 0.0148F^2 - 0.0126D^2$$

即各因素最优参数分别为:碳氮比 1:2.8、装瓶量 46%、大豆蛋白胨质量分数 0.38%,预测的解淀粉芽孢杆菌 L-H15 菌落数为 1.74×10^{10} CFU/g。对预测结果进行试验验证,实际所得菌落数为 1.68×10^{10} CFU/g,该值与模型的预测值基本吻合,与初始优化时 L-H15 的菌落数 9.35×10^8 CFU/g 相比产量有显著提高。

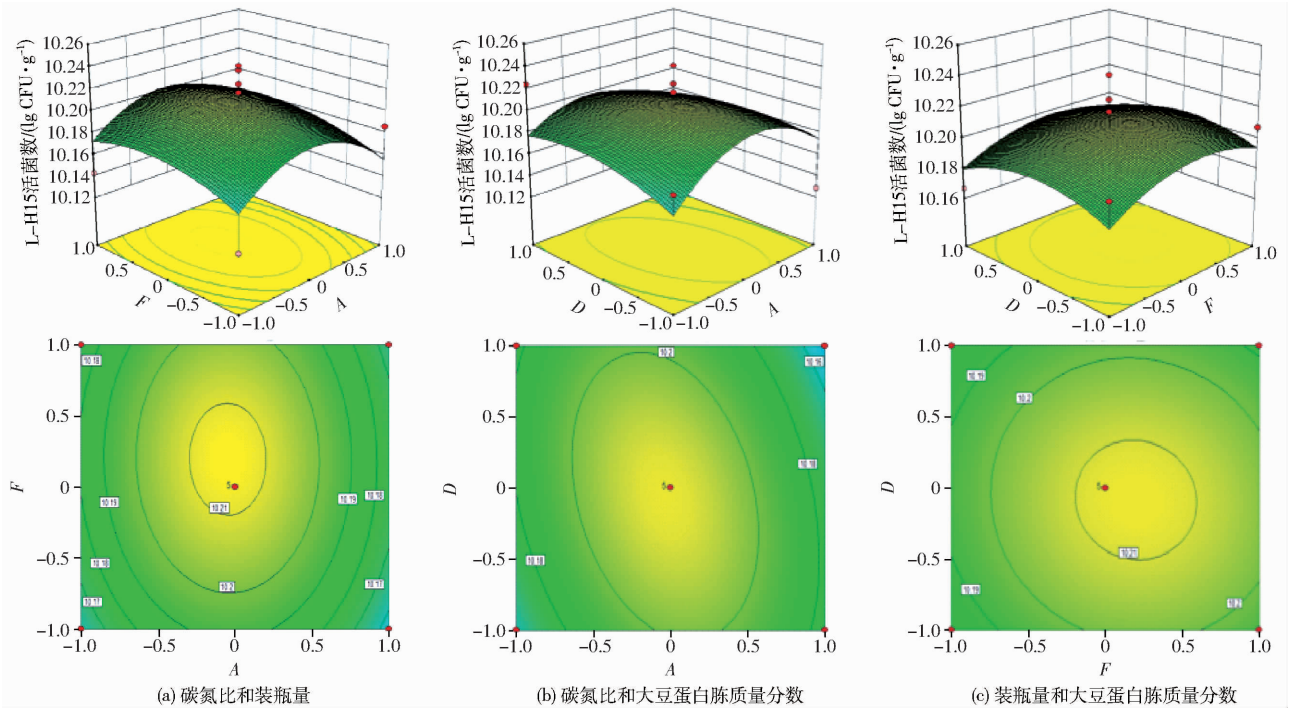


图 4 Box-Behnken 试验模型等高线图和响应面三维图

Fig. 4 Contour maps and response surface three-dimensional diagrams of Box-Behnken experiment

表 8 L-H15 固体发酵菌剂对黄瓜生长指标的影响
Tab.8 Effects of *B. amyloliquefaciens* L-H15 solid fermentation on cucumber seedlings growth

参数	出苗 14 d		出苗 24 d	
	CK	L-H15	CK	L-H15
株高/cm	8.9 ± 1.4 ^x	10.2 ± 1.2 ^y	11.8 ± 1.6 ^b	23.9 ± 1.8 ^a
茎粗/mm	2.64 ± 0.22 ^x	3.29 ± 0.24 ^y	3.16 ± 0.29 ^b	3.45 ± 0.24 ^a
叶面积/cm ²	36.4 ± 2.3 ^x	60.1 ± 5.8 ^y	50.3 ± 4.7 ^b	129.3 ± 14.3 ^a
全株鲜质量/g	1.48 ± 0.06 ^x	1.89 ± 0.20 ^y	2.04 ± 0.08 ^b	3.48 ± 0.15 ^a
全株干质量/g	0.113 ± 0.003 ^x	0.114 ± 0.001 ^x	0.192 ± 0.045 ^b	0.270 ± 0.050 ^a

注:每行英文字母相同者表示差异不显著($P>0.05$)。

2.2.2 根系活力的测定

以四氮唑还原量为横坐标,以 450 nm 波长处吸光度为纵坐标绘制 TTC 标准曲线(图 5)。说明四

2.2 L-H15 对黄瓜苗期促生的效果

2.2.1 黄瓜苗期形态指标测定

由表 8 可以看出,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 固态发酵剂对黄瓜苗期具有良好的促生效果。黄瓜出苗 14 d 时,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 固态发酵剂处理组的植株株高、茎粗、叶面积、全株鲜质量和全株干质量较空白对照组分别提高了 14.61%、24.62%、65.11%、27.70% 和 0.88%;黄瓜出苗 24 d 时,L-H15 固态发酵剂处理组的植株株高、茎粗、叶面积、全株鲜质量和全株干质量较空白对照组分别提高了 103%、9.18%、157%、70.59% 和 40.63%(表 8)。在出苗 24 d L-H15 固态发酵处理组的显著性差异较大,说明 L-H15 固态菌剂对植株的促生作用具有持续性。

氮唑还原量与吸光度之间具有极高的相关性,回归性良好。

如图 6 所示,在黄瓜出苗 14 d 和 24 d 时,解淀

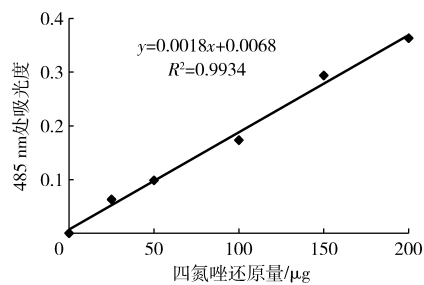


图5 TTC标准曲线

Fig.5 Standard curve of TTC

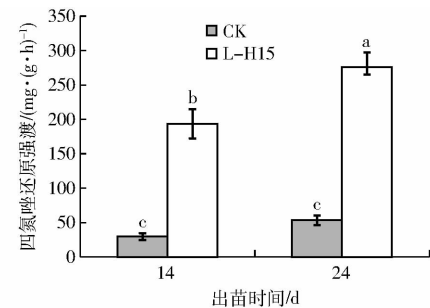


图6 根系活力测定

Fig.6 Determination of root activity

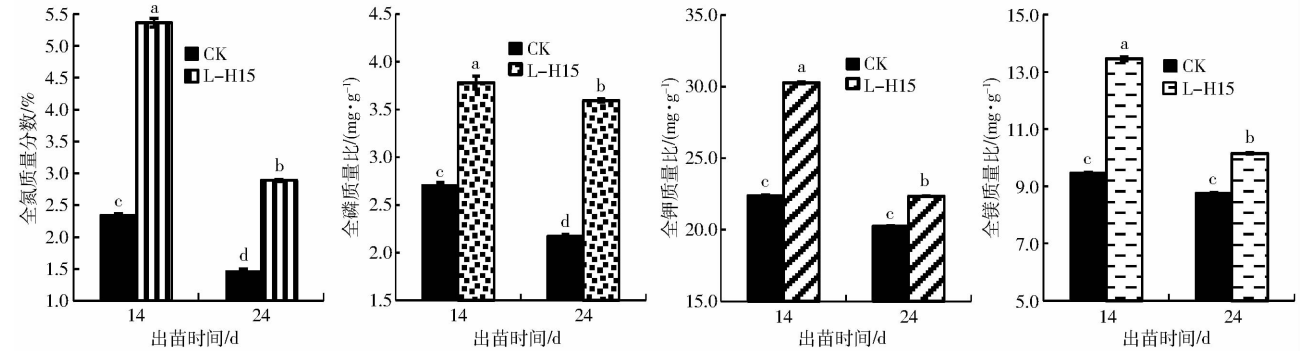


图7 植株矿质元素含量

Fig.7 Determination of plant mineral elements content

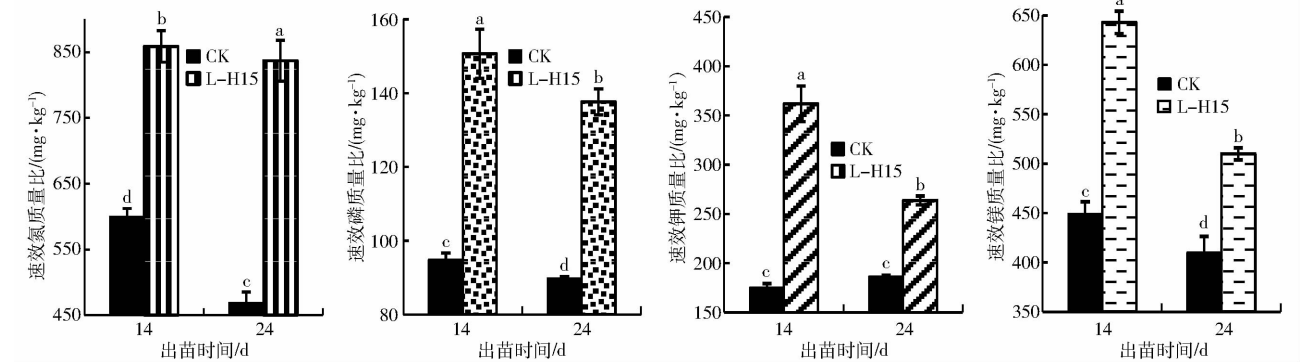


图8 育苗基质速效矿质元素测定

Fig.8 Determination of nursery substrates available mineral elements content

3 讨论

在发酵工艺中,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的活菌数主要由碳氮比、乳糖含量、大豆蛋白胨含量、装瓶量、接种量、液料比、稻谷壳添加量 7 个因素影响。菌株在麦麸和豆粕组成的固态基质中生长良好,不

粉芽孢杆菌 L-H15 固态发酵处理组的根系活力强度均明显高于空白对照组,分别为空白对照组的 6.54 倍和 5.18 倍;黄瓜出苗 24 d 时根系活力强度与 14 d 时相比也呈总体上升趋势。

2.2.3 黄瓜苗期矿物质含量的测定

黄瓜幼苗不同时间和不同处理的矿物质含量如图 7 所示。黄瓜出苗 14 d 时,L-H15 固态发酵处理组与空白对照组相比,植株的全氮、全磷、全钾、全镁含量分别提高了 129%、39.48%、35.27%、42.13%;黄瓜出苗 24 d 时,植株的全氮、全磷、全钾、全镁含量分别提高了 96.60%、65.44%、9.8%、15.73%。

2.2.4 育苗基质速效矿质元素测定

从图 8 中可以看出,在黄瓜出苗 14 d 和 24 d 时,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 固态发酵处理组育苗基质的矿质元素含量均大于空白对照组;黄瓜出苗 24 d 时矿质元素含量较 14 d 时呈总体下降的趋势。

仅能提供碳源和氮源,还能补充其他营养物质。杨柳等^[21]研究结果也表明麦麸和豆粕为芽孢杆菌最适发酵基质,该发酵基质被分解后不易结块,孔隙率和通气性较好,有利于菌株的生长繁殖。本试验中添加果糖对 L-H15 菌体的生长有明显抑制作用,可能因为果糖具有高渗透压,使微生物菌体细胞的

两侧产生浓度差,引起微生物细胞脱水,具体原因还需做进一步的研究。氮源主要为微生物生长提供必需的蛋白质等合成原料,当氮源不足时,微生物的生长受阻。接种量对解淀粉芽孢杆菌L-H15活菌数有显著性影响。当接种量较小时,初始菌株生长缓慢,导致杂菌污染的机率增大,影响发酵产品的质量^[22];接种量过大,会加速固态发酵培养基的消耗,菌体产生大量的次级代谢产物,对菌体繁殖产生抑制作用。液料比主要通过对供氧量和孔隙度两方面的调控来影响固态发酵水平。低液料比时固态基质含水率过低,会影响溶氧能力和传递氧能力;高液料比使固态基质凝结成块,导致多孔性和散热性降低,影响发酵水平。此外,由于解淀粉芽孢杆菌L-H15为好氧菌,稻谷壳坚硬的外壳能够对固态基质起到有效的支撑作用,以此来增加固态基质中空气的流动性。

根系活力是指根系新陈代谢活动的强弱,是反映根系吸收功能的一项综合指标。根系作为植物重要的吸收器官和代谢器官,它的生长发育直接影响到地上部茎叶的生长和作物产量的高低^[23]。解淀粉芽孢杆菌L-H15能够在植株发育前期提高植株的根系活力,有效且持久地促进植株生长。

此外,解淀粉芽孢杆菌L-H15能够显著增强育苗基质中矿质元素的含量。但是,随着黄瓜穴盘苗的生长,育苗基质速效矿质元素含量明显下降,一方面是因为植株会吸收土壤中的矿质元素^[24];另一方面水溶的矿质元素会随着浇水而损失,这符合速效元素被利用的规律^[25]。

4 结论

(1)通过优化解淀粉芽孢杆菌L-H15的营养体菌落数,确定了固态发酵的最佳条件,即麦麸和豆粕的碳氮比为1:2.8,添加20%的稻谷壳;外源物添加量百分比按固态基质质量为基准,其中乳糖质量分数0.2%,大豆蛋白胨质量分数0.38%,液料比0.5 mL/g,装瓶量46%。此时解淀粉芽孢杆菌L-H15活菌数为 1.68×10^{10} CFU/g。

(2)解淀粉芽孢杆菌L-H15固态发酵菌剂能明显促进黄瓜的茎粗、株高、叶面积及生物量的累积($P < 0.05$);与空白对照相比,添加固态菌剂L-H15的处理组根系活力增强,矿质元素含量也有显著性提高。因此,解淀粉芽孢杆菌L-H15可用于制备微生物肥料。

参 考 文 献

- 1 COOK R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31: 53-80.
- 2 FARIA D C, DIAS A C, MELO I S, et al. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(2): 217-221.
- 3 RANDY O C, HEXON A C, LOURDES M R. The role of microbial signals in plant growth and development[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(8): 701-712.
- 4 BOUTARD H C, SMART C D, THALER J, et al. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria and natural enemies on *myzus persicae* infestations in pepper[J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(6): 2183-2191.
- 5 SEN R, SWAMINATHAN T. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(4): 358-363.
- 6 姚露燕, 张水华, 曹昱, 等. 金属离子浓度对枯草芽孢杆菌芽孢率的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(8): 770-772.
- 7 YAO Luyan, ZHANG Shuihua, CAO Yu, et al. Effect of metal ion concentration on sporulation efficiency of *Bacillus subtilis*[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(8): 770-772. (in Chinese)
- 7 BLACK E P, WEI J, ALTUR I, et al. Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(7): 65-76.
- 8 徐世荣, 陈骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-126.
- 9 XU Shirong, CHEN Xiang, WU Yunpeng. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4): 121-126. (in Chinese)
- 9 杜英. 利用玉米秸秆发酵生产芽孢杆菌肥料的研究[D]. 保定: 河北大学, 2013.
- 10 DU Ying. Study on production of *Bacillus* using corn stalk[D]. Baoding: Hebei University, 2013. (in Chinese)
- 10 SHIH Ing-Lung, KUO Chia-Yu, HSIEH Feng-Chia, et al. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for Iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation[J]. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 2008, 39: 635-643.
- 11 沈德龙, 李俊, 姜昕. 我国生物有机肥的发展现状及展望[J]. 中国农技推广, 2007, 23(9): 35-37.
- 12 SHEN Delong, LI Jun, JIANG Xin. Development status and prospect of microbial organic fertilizer in China[J]. China Agricultural Technology Extension, 2007, 23(9): 35-37. (in Chinese)
- 12 FISHER K, NEWTON W E. Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics, 2005, 1750(2): 154-165.

13 MRKOVACKI N, MILIC V. Use of azotobacterchroococcum as potentially useful in agricultural application [J]. Annals of Microbiology, 2001, 51(2): 145 – 158.

14 张武,杨琳,王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(5): 810 – 821.
ZHANG Wu, YANG Lin, WANG Zijuan. Advance and development trend of biological nitrogen fixation research[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2015, 30(5): 810 – 821. (in Chinese)

15 章家恩, 刘文高. 微生物资源的开发利用与农业可持续发展[J]. 土壤与环境, 2001, 10(2): 154 – 157.
ZHANG Jiaen, LIU Wen'gao. Utilization of microbes resources and sustainable development of agriculture [J]. Soil and Environmental Sciences, 2001, 10(2): 154 – 157. (in Chinese)

16 WELLER D M, THOMASHOW L S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere[M] // Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Releas of GMOs. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007: 1 – 18.

17 陈家长, 简纪常, 胡庚东, 等. 利用有益微生物改善养殖生态环境的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 33 – 36.
CHEN Jiazhang, JIAN Jichang, HU Gengdong, et al. Study of using microbacteria to improve the water environment of aquaculture [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2002, 22(4): 33 – 36. (in Chinese)

18 刘淑琮, 冯妍, 于洁. 植物根际促生菌的研究进展及其环境作用[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2882 – 2883.
LIU Shucong, FENG Xin, YU Jie. Research progress of plant growth-promoting rhizobacteria and its environmental effects[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(11): 2882 – 2883. (in Chinese)

19 GRAY E J, SMITH D L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(3): 395 – 412.

20 王卉,游成真,秦宇轩, 等. 解淀粉芽孢杆菌 L – S60 生物学特性及其固态发酵工艺研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(9): 133 – 142.
WANG Hui, YOU Chengzhen, QIN Yuxuan, et al. The biological characteristics and solid-state fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* L – S60[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(9): 133 – 142. (in Chinese)

21 杨柳, 郑华张, 张邑帆, 等. 凝结芽孢杆菌芽孢高产固体发酵的研究[J]. 家畜生态学报, 2013, 34(7): 49 – 52.
YANG Liu, ZHENG Huazhang, ZHANG Yifan, et al. Optimaization of conditions on spore production from *Bacillus coagulans* using solid state fermentation method[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2013, 34(7): 49 – 52. (in Chinese)

22 梁雪杰, 刘卹洲, 张荣胜, 等. 生防菌 PTS – 394 发酵培养基及培养条件的优化[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 34(3): 75 – 82.
LIANG Xuejie, LIU Youzhou, ZHANG Rongsheng, et al. Optimization of fermentation medium and conditions of *Bacillus subtilis* PTS – 394[J]. Journal of Yangzhou University: Agricultural and Life Science Edition, 2013, 34(3): 75 – 82. (in Chinese)

23 JORDAN V, GUILHEM D, MARIE L B, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 11 – 19.

24 李胜利, 孙治强, 魏国强, 等. 不同施肥处理对温室基质栽培黄瓜产量与品质的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(4): 246 – 248.
LI Shengli, SUN Zhiqiang, WEI Guoqiang, et al. Effects of different fertilizer application levels on cucumber yield and quality in greenhouse substrateculture[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2003, 34(4): 246 – 248. (in Chinese)

25 王红梅, 黄光. 有机生态型基质对大棚甜椒生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(4): 590 – 591.
WANG Hongmei, HUANG Guang. The influence of different stroma on the growth of pepper in greenhouse[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2002, 30(4): 590 – 591. (in Chinese)