

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.04.004

## 复合微生物菌肥主要功能菌发酵培养优化研究

金开铭<sup>1</sup>, 田彬<sup>2</sup>, 盛玉珍<sup>3</sup>, 熊咏梅<sup>1</sup>, 徐磊<sup>1</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 王丽<sup>3\*</sup>

(1. 喜德县林业局, 四川 喜德 616750; 2. 长江造林局攀枝花分局, 四川 攀枝花 617000;

3. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081)

**摘要:**通过优化复合微生物菌肥主要功能菌的发酵培养基配方及其发酵条件,提高发酵液中功能菌的活菌含量,以期为大规模生产复合微生物菌肥奠定基础。利用单因素实验结合正交的方法,以菌体生长量( $OD_{600}$ )为测定指标,对复合微生物菌肥主要功能菌中的固氮菌、溶磷菌和解钾菌的发酵培养基进行优化。结论:①固氮菌培养基的最优组合为麦芽糖7.5 g、蛋白胨15 g、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0.3 g、 $K_2HPO_4$  0.5 g、 $FeCl_3$  0.2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,最佳pH值6.8,最佳接种量为100 mL,最佳转速为 $180 r \cdot min^{-1}$ 最佳发酵温度为 $30^\circ C$ ;②溶磷菌培养基的最优组合为麦芽糖7.5 g、蛋白胨15 g、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0.3 g、 $K_2HPO_4$  0.5 g、 $FeCl_3$  0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,最佳pH值6.4,最佳接种量为300 mL,最佳转速为 $180 r \cdot min^{-1}$ 最佳发酵温度为 $30^\circ C$ ;③解钾菌培养基的最优组合为甘露醇7.5 g、牛肉膏15 g、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0.3 g、 $K_2HPO_4$  0.5 g、 $FeCl_3$  0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,最佳pH值7.6,最佳接种量为100 mL,最佳转速为 $180 r \cdot min^{-1}$ 最佳发酵温度为 $34^\circ C$ 。

**关键词:**固氮菌;溶磷菌;解钾菌;培养基;优化

中图分类号:S714.3 文献标识码:A

文章编号:1003-5508(2019)04-0017-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Culture Medium and Fermentation Process Optimization of Function Bacteria for Compound Microbial Fertilizer

JIN Kai-ming<sup>1</sup> TIAN Bin<sup>2</sup> SHENG Yu-zhen<sup>3</sup> XIONG Yong-mei<sup>1</sup>

XU Lei<sup>1</sup> ZHANG Ling<sup>1</sup> WANG Li<sup>1\*</sup>

(1. Forestry Bureau of Xide Country, Xide 616750, China;

2. Panzihua Branch of the Yangtze River Forestation Bureau, Panzihua 617000, China;

3 Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China)

**Abstract:** In this paper culture medium and fermentation process of function bacteria was optimized to improve the living bacterium content for compound microbial fertilizers, and in the purpose of contribution to the basis for the mass production of compound microbial fertilizer. The experiments with one factor and orthogonal design were conducted to optimize culture medium and fermentation process of nitrogen-fixing bacteria, phosphate-solubilizing bacteria and potassium-solubilizing bacteria for compound microbial fertilizers. The results showed that (1) the optimal medium for nitrogen-fixing bacteria was 7.5 g maltose, 15 g peptone, 0.03 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.2 g  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.2 g  $FeCl_3$  and 0.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , and the optimal culture condition included initial medium pH of 6.4 with inoculum size

收稿日期:2019-06-21

项目基金:四川省财政专项“基于微生物修复的退化紫色土土壤质量及生态风险评价”(2019CZZX35)

作者简介:金开铭(1977-),男,工程师,主要从事植被恢复研究,e-mail:1090257463@qq.com。

\*通讯作者:王丽(1982-),女,山东莘县人,副研究员,博士,主要从事森林土壤研究,e-mail:vengly@163.com。

of 100 mL, rotation speed of  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , and the optimal fermentation condition was  $30^\circ\text{C}$ . (2) the optimal medium for phosphate-solubilizing bacteria was 7.5 g maltose, 15 g peptone, 0.03 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{FeCl}_3$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and the optimal culture condition included initial medium pH of 6.8 with inoculum size of 300 mL, rotation speed of  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , and the optimal fermentation condition was  $30^\circ\text{C}$ . (3) the optimal medium for potassium-solubilizing bacteria was 7.5 g mannitol, 15 g beef extract, 0.03 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{FeCl}_3$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and the optimal culture condition included initial medium pH of 7.6 with inoculum size of 100 mL, rotation speed of  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , and the optimal fermentation condition was  $34^\circ\text{C}$ .

**Key words:** Azotobacter, Phosphorus-solubilizing bacteria, Potassium bacteria, Culture medium, Optimization

微生物肥料是一种带有活菌体的辅助性肥料,通过微生物种群间的生命活动及其代谢产物的共同作用,直接或间接地分解、合成能促进植物生长发育的物质,增强抗逆性、抗病虫性<sup>[1]</sup>。施用微生物肥料不仅可以增加营养物质,还因其含有大量的有益微生物,施入土壤后,通过有益微生物的大量繁殖而发挥其固氮、磷钾释放、扩大根系吸收面积和抑制有害病菌繁殖的作用。目前,微生物菌肥的使用已越来越广泛<sup>[2-8]</sup>,功能微生物菌群作为复合微生物肥料的核心部分,是微生物肥料生产中的关键技术。培养基配比及发酵条件对菌体生长的影响较大。胡秀芳<sup>[9]</sup>,杨镗<sup>[10]</sup>等均开展微生物菌肥主要功能菌发酵技术研究,探究其最佳的发酵条件,为规模化生产微生物肥料提供科学指导。

微生物发酵的生产水平不仅取决于生产菌先天的特性,而且还需要合适的发酵条件,这样才能使菌株的生产能力充分发挥出来。发酵条件的优化是菌株应用到实际生产中所经历的一个重要环节,直接关系到菌剂的质量和生产效益<sup>[11]</sup>。本研究选取微生物肥料中的主要功能菌即固氮菌、溶磷菌和解钾菌,利用单因素结合正交实验方案,筛选最适合菌株发酵生长的培养基及其发酵条件,为以后的微生物肥料开发奠定理论依据。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌种

实验所用到的菌种固氮菌、溶磷菌、解钾菌菌种购自北京北纳创联生物技术研究院商城分院(BNCC),菌种的详细信息分别为:

固氮菌:褐球固氮菌, *Azotobacter chroococcum*, 资源编号 BNCC192292, 其他编号 = BN24, 用于生产固氮菌肥料。

溶磷菌:巨大芽孢杆菌, *Bacillus megaterium*, 资源编号 BNCC190686, 可用于生产解磷细菌肥料。

解钾菌:胶冻样芽孢杆菌, *Bacillus mucilaginosus*, 资源编号 BNCC195271, 钾细菌。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.2 ~ 7.4,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 19 min。固体培养基另加琼脂粉 15 g。

基础发酵培养基:根据许净净等<sup>[17]</sup>的报道,基础发酵培养基采用葡萄糖 5g、蛋白胨 10 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.2 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.2 ~ 7.4,  $113^\circ\text{C}$  灭菌 19 min。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌种的活化

将保存在  $-70^\circ\text{C}$  的菌种接种于新鲜的 LB 固体培养基上,连续活化两次,  $28^\circ\text{C}$  恒温培养 18 h。取新鲜 LB 固体培养基一环菌种,接种于 LB 液体培养基中,往复式摇床  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $28^\circ\text{C}$  恒温培养 24h 后备用。

### 1.2.2 生长曲线测定

采用比浊法测定菌体量:①将活化好的固氮菌、解磷菌、解钾菌接种到 50 mL 的 LB 液体培养基中,以未接种的培养基作为空白对照;②将培养液置于恒温摇床上以  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的转速  $30^\circ\text{C}$  振荡培养;③用分光光度计,从 0 时开始,每隔 5h 于波长 600 nm 处测定培养液的 OD 值,每次测定时以空白对照调仪器零点,每次取样 2 mL;④以时间为横坐标,以

OD 值为纵坐标,制作曲线,即为细菌在该培养条件下的生长曲线。

### 1.2.3 培养基成分的筛选

#### (1) 培养基碳源的优化

分别以 5 g 淀粉、麦芽糖、蔗糖、甘露醇替换基础发酵培养基中的葡萄糖,其他条件不变,250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL,每个三角瓶中接入 5 mL 的菌液,于 30℃,150 r·min<sup>-1</sup> 条件下摇床培养。取对数生长期的菌液测其 OD<sub>600</sub> 值。

#### (2) 培养基氮源优化

碳源采用上述单因子实验筛选的碳源为最优碳源,氮源分别以 10 g H<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、酵母浸膏、尿素、牛肉浸膏替换基础发酵培养基中的蛋白胨,其他条件不变,方法同上。

#### (3) 培养基无机盐优化

采用以上单因子实验得到的最优碳源、最优氮源代替基础培养基中的碳源和氮源,无机盐分别采用 FeCl<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、ZnCl<sub>2</sub>,其他成分不变,方法同上。

#### (4) 培养基优化正交实验

采用三因素三水平正交实验表,使用单因子实验所测定的最适碳源、氮源、无机盐配制不同浓度的发酵培养基,进行发酵培养,见表 1。250 mL 三角瓶中装液量为 100 mL,每个三角瓶中接入 1 mL 的菌液,于 30℃,150 r·min<sup>-1</sup> 条件下摇床培养。取对数生长期的菌液测其 OD<sub>600</sub> 值。

表 1 正交实验设计

水平	因素		
	碳源/g	氮源/g	无机盐/g
1	2.5	5	0.1
2	5	10	0.2
3	7.5	15	0.5

### 1.2.4 发酵条件优化

以优化的碳源、氮源及无机盐配制培养基,采用单因子试验进行最适 pH、接种量、转速和培养温度优化。初始 pH 设置为 6.4、6.8、7.2、7.6 和 8,接种量设置为 1%、2.5%、4%、5.5% 和 7%,转速设置为 90 r·min<sup>-1</sup>、120 r·min<sup>-1</sup>、150 r·min<sup>-1</sup>、180 r·min<sup>-1</sup> 和 210 r·min<sup>-1</sup>,温度设置为 22℃、26℃、30℃、34℃ 和 38℃ 其他条件不变,方法同上。

### 1.2.5 数据处理

实验数据均为 3 次重复的平均值,采用 Mi-

crosoft Excel 2003 软件作图。

## 2 实验结果

### 2.1 生长曲线测定

通过测定 OD<sub>600</sub> 的吸光度值来反应菌液的菌体浓度。对数期的菌体生长代谢较为旺盛,将对数生长期的菌体接入发酵培养基,能缩短发酵周期,提高设备的利用率。从图 1 可知道,固氮菌在 5 h 左右进入对数生长期,30 h 左右进入稳定期,在 25 h 左右进入对数生长末期,之后 OD 值变化不大,菌体浓度达到最大,此时是菌株的最佳种龄。溶磷菌在 2.5 h 左右进入对数生长期,30 h 左右进入稳定期,在 22.5 h 左右进入对数生长末期,之后 OD 值变化不大,菌体浓度达到最大,此时是菌株的最佳种龄。解钾菌在 5 h 左右进入对数生长期,25 h 左右进入稳定期,在 20 h 左右进入对数生长末期,之后 OD 值变化不大,菌体浓度达到最大,是菌株的最佳种龄。

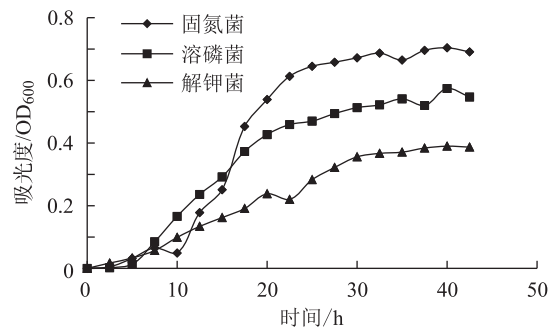


图 1 固氮菌、溶磷菌、解钾菌生长曲线

Fig. 1 The growth curve of the nitrogen-fixing bacteria, the phosphate-solubilizing bacteria and the potassium-releasing bacteria

### 2.2 最佳培养基成分的确定

#### 2.2.1 最佳碳源、氮源、无机盐筛选

固氮菌最佳碳源、氮源、无机盐筛选见表 2,从表中可以看出,当以麦芽糖为碳源时,菌液的浓度最大,其 OD<sub>600</sub> 为 1.001,当以甘露醇为碳源时,OD<sub>600</sub> 为 0.677,菌液浓度最小,因此最佳碳源为麦芽糖。在最佳氮源的筛选实验中,当以蛋白胨为唯一氮源时,发酵液浓度最大,OD<sub>600</sub> 为 0.873,当以尿素为氮源时,OD<sub>600</sub> 为 -0.008,几乎没有发酵,故最佳氮源为蛋白胨。当以麦芽糖为碳源,以蛋白胨为氮源时,添加无机盐 FeCl<sub>3</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 时发酵液的 OD<sub>600</sub> 分别为 0.595 和 0.713,发酵效果较好,因此选择无

机盐  $\text{FeCl}_3$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  在正交实验中进行优化。

表2 固氮菌培养基添加不同碳源、氮源和无机盐时发酵液  $\text{OD}_{600}$  值

Tab.2 The  $\text{OD}_{600}$  of the nitrogen-fixing bacteria under the different C source, the N source and the inorganic salt source

碳源	$\text{OD}_{600}$	氮源	$\text{OD}_{600}$	无机盐	$\text{OD}_{600}$
葡萄糖	0.832	蛋白胨	0.873		
淀粉	0.851	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.065	$\text{FeCl}_3$	0.595
麦芽糖	1.001	酵母浸膏	0.829	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.713
蔗糖	0.875	尿素	-0.008	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.017
甘露醇	0.677	牛肉膏	0.753	$\text{ZnCl}_2$	0.015

溶磷菌最佳碳源、氮源、无机盐筛选见表3,从表中可以看出,当以麦芽糖为碳源时,菌液的浓度最大,其  $\text{OD}_{600}$  为 0.857,当以甘露醇为碳源时, $\text{OD}_{600}$  为 0.713,菌液浓度最小,因此最佳碳源为麦芽糖。在最佳氮源的筛选实验中,当以蛋白胨为唯一氮源时,发酵液浓度最大, $\text{OD}_{600}$  为 0.814,当以尿素为氮源时, $\text{OD}_{600}$  为 0.023,几乎没有发酵,故最佳氮源为蛋白胨。当以麦芽糖为碳源,以蛋白胨为氮源时,添加无机盐  $\text{FeCl}_3$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  时发酵液的  $\text{OD}_{600}$  分别为 0.557 和 0.665,发酵效果较好,因此选择机盐  $\text{FeCl}_3$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  在正交实验中进行优化。

表3 溶磷菌培养基添加不同碳源、氮源和无机盐时发酵液  $\text{OD}_{600}$  值

Tab.3 The  $\text{OD}_{600}$  of the phosphate-solubilizing bacteria under the different C source, the N source and the inorganic salt source

碳源	$\text{OD}_{600}$	氮源	$\text{OD}_{600}$	无机盐	$\text{OD}_{600}$
葡萄糖	0.753	蛋白胨	0.814		
淀粉	0.792	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.141	$\text{FeCl}_3$	0.577
麦芽糖	0.857	酵母浸膏	0.729	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.665
蔗糖	0.815	尿素	0.023	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.009
甘露醇	0.713	牛肉膏	0.781	$\text{ZnCl}_2$	0.005

解钾菌最佳碳源、氮源、无机盐筛选见表4,从表中可以看出,当以甘露醇为碳源时,菌液的浓度最大,其  $\text{OD}_{600}$  为 0.529,当以蔗糖为碳源时, $\text{OD}_{600}$  为 0.160,菌液浓度最小,因此最佳碳源为甘露醇。在最佳氮源的筛选实验中,当以牛肉膏为唯一氮源时,发酵液浓度最大, $\text{OD}_{600}$  为 0.571,当以尿素为氮源时, $\text{OD}_{600}$  为 0.002,几乎没有发酵,故最佳氮源为牛肉膏。当以为甘露醇碳源,以牛肉膏为氮源时,添加无机盐  $\text{FeCl}_3$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  时发酵液的  $\text{OD}_{600}$  分别为 0.327 和 0.250,因此选择机盐  $\text{FeCl}_3$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  在正交实验中进行优化。

表4 解钾菌培养基添加不同碳源、氮源和无机盐时发酵液  $\text{OD}_{600}$  值

Tab.4 The  $\text{OD}_{600}$  of the potassium-releasing bacteria under the different C source, the N source and the inorganic salt source

碳源	$\text{OD}_{600}$	氮源	$\text{OD}_{600}$	无机盐	$\text{OD}_{600}$
葡萄糖	0.268	蛋白胨	0.257		
淀粉	0.179	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.045	$\text{FeCl}_3$	0.327
麦芽糖	0.182	酵母浸膏	0.375	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.250
蔗糖	0.160	尿素	0.002	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.033
甘露醇	0.529	牛肉膏	0.571	$\text{ZnCl}_2$	0.105

2.2.2 培养基优化正交实验

实验选取  $L_93^4$  正交表,利用上文单因素筛选出来的最佳碳源(A)、氮源(B)、无机盐(C和D),每个实验重复3次,结果见表5~7。

固氮菌培养基优化的实验结果见表5,极差R表示各因素对菌体生长影响的强弱,由表中可知,影响固氮菌发酵液中菌液浓度的因素依次为 R 蛋白胨 > R 麦芽糖 > R  $\text{FeCl}_3$  >  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。K表示同一因素间不同浓度对菌体生长的影响,K1水平1,K2表示水平2,K3表示水平3,从表中可以看出,发酵结果最优的水平为  $A_3B_3C_2D_3$ ,即葡萄糖浓度 7.5g/L,蛋白胨浓度  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{FeCl}_3$  浓度  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时对菌体生长最为有利,此时最佳培养基的成分为麦芽糖 7.5 g、蛋白胨 15 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{FeCl}_3$  0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g。

表5 固氮菌培养基优化正交实验表

Tab.5 Orthogonal experimental design of the nitrogen-fixing bacteria

项目	A	B	C	D	$\text{OD}_{600}$
	麦芽糖 $/(g \cdot L^{-1})$	蛋白胨 $/(g \cdot L^{-1})$	$\text{FeCl}_3$ $/(g \cdot L^{-1})$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $(g \cdot L^{-1})$	
1	2.5	5	0.1	0.1	0.442
2	2.5	10	0.2	0.2	0.555
3	2.5	15	0.5	0.5	0.755
4	5	5	0.2	0.5	0.733
5	5	10	0.5	0.1	0.751
6	5	15	0.1	0.2	0.838
7	7.5	5	0.5	0.2	0.686
8	7.5	10	0.1	0.5	0.874
9	7.5	15	0.2	0.1	0.939
K1	1.752	1.861	2.154	2.132	
K2	2.322	2.180	2.227	2.079	
K3	2.499	2.532	2.192	2.362	
T1	0.584	0.620	0.718	0.711	
T2	0.774	0.727	0.742	0.693	
T3	0.833	0.844	0.731	0.787	
R	0.059	0.117	0.024	0.016	

注:K为每个因素同水平之和;T为K的均值;R极差。

溶磷菌培养基优化的实验结果见表 6,由表中可知,影响溶磷菌发酵液中菌液浓度的因素依次为 R 麦芽糖 > R 蛋白胨 > R FeCl<sub>3</sub> > MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,发酵结果最优的水平为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即葡萄糖浓度 7.5 g · L<sup>-1</sup>,蛋白胨浓度 15 g · L<sup>-1</sup>,FeCl<sub>3</sub> 浓度 0.5 g · L<sup>-1</sup>,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 浓度为 0.5 g · L<sup>-1</sup>时对菌体生长最为有利,此时最佳培养基的成分为麦芽糖 7.5 g、蛋白胨 15 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.3 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、FeCl<sub>3</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g。

表 6 溶磷菌培养基优化正交实验表

Tab. 6 Orthogonal experimental design of the phosphate-solubilizing bacteria

因素	A 麦芽糖 /(g·L <sup>-1</sup> )	B 蛋白胨 /(g·L <sup>-1</sup> )	C FeCl <sub>3</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	D MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g·L <sup>-1</sup> )	OD <sub>600</sub>
1	2.5	5	0.1	0.1	0.426
2	2.5	10	0.2	0.2	0.464
3	2.5	15	0.5	0.5	0.690
4	5	5	0.2	0.5	0.651
5	5	10	0.5	0.1	0.711
6	5	15	0.1	0.2	0.745
7	7.5	5	0.5	0.2	0.676
8	7.5	10	0.1	0.5	0.731
9	7.5	15	0.2	0.1	0.770
K1	1.580	1.753	1.902	1.907	
K2	2.107	1.906	1.855	1.855	
K3	2.177	2.205	2.077	2.072	
T1	0.527	0.584	0.634	0.636	
T2	0.702	0.635	0.618	0.618	
T3	0.723	0.735	0.692	0.691	
R	0.196	0.151	0.074	0.073	

注:K 为每个因素同水平之和;T 为 K 的均值;R 极差。

解钾菌培养基优化的实验结果见表 7,由表中可知,影响溶磷菌发酵液中菌液浓度的因素依次为

表 7 解钾菌培养基优化正交实验表

Tab. 7 Orthogonal experimental design of the potassium-releasing bacteria

因素	A 甘露醇 /(g·L <sup>-1</sup> )	B 牛肉膏 /(g·L <sup>-1</sup> )	C FeCl <sub>3</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	D MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O /(g·L <sup>-1</sup> )	OD <sub>600</sub>
1	2.5	5	0.1	0.1	0.426
2	2.5	10	0.2	0.2	0.464
3	2.5	15	0.5	0.5	0.690
4	5	5	0.2	0.5	0.651
5	5	10	0.5	0.1	0.711
6	5	15	0.1	0.2	0.745
7	7.5	5	0.5	0.2	0.676
8	7.5	10	0.1	0.5	0.731
9	7.5	15	0.2	0.1	0.770
K1	0.968	1.109	1.234	1.217	
K2	1.369	1.132	1.194	1.324	
K3	1.579	1.693	1.506	1.393	
T1	0.323	0.370	0.411	0.406	
T2	0.456	0.377	0.398	0.441	
T3	0.526	0.564	0.502	0.464	
R	0.203	0.194	0.104	0.058	

注:K 为每个因素同水平之和;T 为 K 的均值;R 极差。

R 甘露醇 > R 牛肉膏 > R FeCl<sub>3</sub> > MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,发酵结果最优的水平为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即葡萄糖浓度 7.5 g · L<sup>-1</sup>,蛋白胨浓度 15 g · L<sup>-1</sup>,FeCl<sub>3</sub> 浓度 0.5 g · L<sup>-1</sup>,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 浓度为 0.5 g · L<sup>-1</sup>时对菌体生长最为有利,此时最佳培养基的成分为甘露醇 7.5 g、牛肉膏 15 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.3 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、FeCl<sub>3</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g。

## 2.3 讨论

### 2.3.1 初始 pH 优化

从图 2 可以看出不同初始 pH 条件对菌株的生长有一定影响。具体来说,pH 对固氮菌菌体生长的影响范围较宽,初始 pH 在 6.8 ~ 8.0 范围内,菌体均能较好生长。当 pH 值为 6.4 ~ 6.8 时,固氮菌的生长量呈上升趋势,当 pH 值为 6.8 ~ 8 时,生长量随着 pH 值的增大而减少,当 pH 值为 6.8 时,发酵液的 OD<sub>600</sub> 为最大,达到 1.085,因此固氮菌的最佳发酵 pH 值为 6.8。

对于溶磷菌来说,随着 pH 值得增大,菌体的生长量呈缓慢下降的趋势,当 pH 值为 6.4 时,菌体的生长量达到最大,因此溶磷菌的最佳发酵 PH 值为 6.4。

对于解钾菌来说,随着 pH 值得上升,菌体生长量呈缓慢上升的趋势,之后随着 pH 的继续增大,菌体的生长量迅速下降,说明发酵液的 pH 过高不利于解钾菌的生长,当 pH 为 7.6 时菌体的生长量达到最大,因此解钾菌的最佳发酵 pH 值为 7.6。

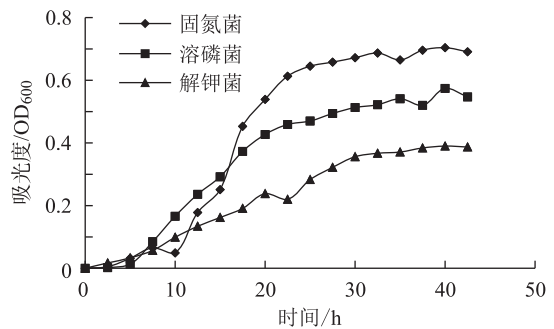


图 2 不同 pH 值对菌株发酵生长的影响

Fig. 2 Effect of the different pH on the growth of flora combination

### 2.3.2 接种量优化

接种量对菌体的影响如图 3 所示,对于固氮菌来说,当接种量在 50 uL ~ 100 uL 时,菌体的生长量

逐渐上升,当接种量在 300 uL ~ 400 uL,菌体生长量呈缓慢下降的趋势,说明高接种量并不利于菌株的生长,当接种量为 100 uL 时,菌体的生长达到最大,此时为最佳的接种量,即 100 mL 发酵液中加入 100 uL 菌液时,最有利于固氮菌的生长。

对于解磷菌来说,当接种量在 50 uL ~ 300 uL 时,菌体的生长量逐渐上升,当接种量在 300 uL ~ 400 uL,菌体生长量呈缓慢下降的趋势,因此解磷菌最佳的接种量为 300 uL。

对于解钾菌来说,接种量对解钾菌的生长的影响总体趋势变化不明显,当接种量在 50 uL ~ 100 uL 时,菌体的生长量逐渐上升,当接种量在 300 uL ~ 400 uL,菌体生长量呈缓慢下降的趋势,当接种量为 100 uL 时,发酵液中菌体的生长量最佳。

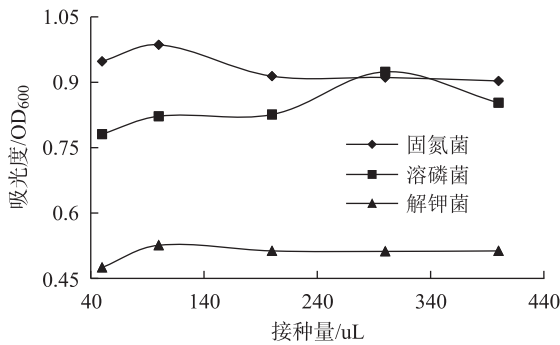


图3 不同接种量对菌株发酵生长的影响

Fig. 3 Effect of the different inoculum quantity on the growth of flora combination

### 2.3.3 转速优化

由图4可知,转速对固氮菌、溶磷菌、解钾菌生长的影响趋势一致,当转速在  $90 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \sim 180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时,随着转速的增加,菌株的生长量逐渐增加,当转速达到  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时,发酵液的 OD 值达到最大,当转速继续升高时,菌体的 OD 值有所下降。因此当转速为  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时为固氮菌、溶磷菌、解钾菌生长的最佳转速。

### 2.3.4 培养温度的优化

从图5可以看出,温度过高过低都不利于菌株的生长。温度对固氮菌、溶磷菌生长的影响趋势一致,当温度在  $22^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$  范围内,菌体的生长量呈逐渐上升的趋势,当温度在  $30^\circ\text{C} \sim 38^\circ\text{C}$  范围内,菌体的生长量呈缓慢下降的趋势,当温度为  $30^\circ\text{C}$  时,菌体的生长量达到最大,因此固氮菌、溶磷菌最佳的发酵温度为  $30^\circ\text{C}$ 。

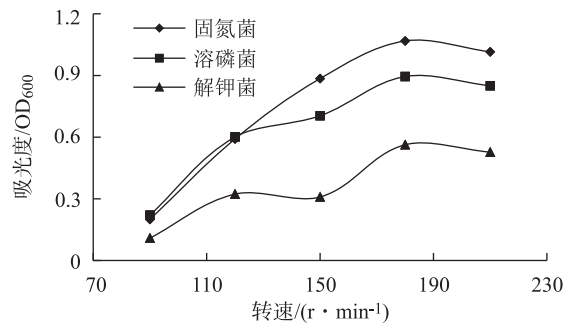


图4 不同转速对菌株发酵生长的影响

Fig. 4 Effect of the different revolution on the growth of flora combination

对于解钾菌来说,当温度  $22^\circ\text{C} \sim 34^\circ\text{C}$  范围内,菌株的生长量呈上升的趋势,当温度在  $34^\circ\text{C} \sim 38^\circ\text{C}$  范围内,菌株的生长量略微有所下降,当温度为  $34^\circ\text{C}$  时菌体的生长量达到最大,此时为解钾菌最佳的发酵温度。

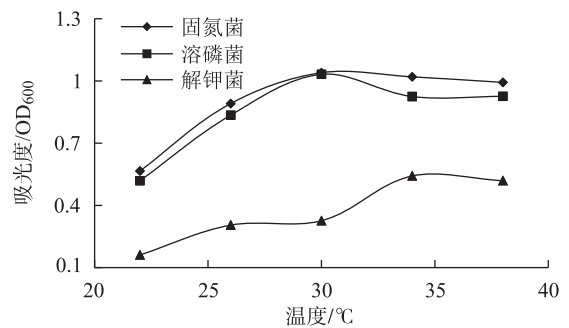


图5 不同温度对菌株发酵生长的影响

Fig. 5 Effect of the different temperature on the growth of flora combination

## 3 总结

综合先前的研究经验,本研究主要选择了培养基、初始 pH、接种量、转速、培养温度等 5 个因素进行实验。通过采用单因素实验结合正交法实验对上述各因素进行优化可知,固氮菌培养基的最优组合为麦芽糖 7.5 g、蛋白胨 15 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{FeCl}_3$  0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,最佳 pH6.8,最佳接种量为 100 mL,最佳转速为  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  最佳发酵温度为  $30^\circ\text{C}$ ,此时菌体的生长量最大,OD<sub>600</sub> 为 1.085。利用基础培养基发酵时固氮菌的 OD<sub>600</sub> 0.832,因此优化后的培养基的发酵效率比基础培养基的发酵效率提高了 30.4%。溶磷菌培养基的最优组合为麦芽糖 7.5 g、蛋白胨 15 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{FeCl}_3$  0.5 g、

(下转第 27 页)

土壤的流失。

### 参考文献:

- [1] 王飞龙,陈明. 贵州西部山区泥石流流域土壤侵蚀量分析——以贵州省威宁县二塘河流域为例[J]. 人民长江,2018,49(21):36~39+55.
- [2] 李明伟. 辽西地区不同水土保持措施条件下土壤侵蚀量与降雨因子关系研究[J]. 中国水土保持,2018(08):29~33+69.
- [3] 姜义亮,郑粉莉,温磊磊,等. 降雨和汇流对黑土区坡面土壤侵蚀的影响试验研究[J]. 生态学报,2017,37(24):8207~8215.
- [4] 孙蓓,潘晓颖,李建明. 模拟降雨条件下开挖面土壤侵蚀测算模型研究[J]. 人民长江,2019,50(01):39~45+69.
- [5] 何永彬,徐娟. 雨季期间不同耕作形式旱坡地的土壤侵蚀动态特征[J]. 云南地理环境研究,2018,30(05):15~21.
- [6] 温永福,高鹏,穆兴民,等. 降雨强度对梯田边坡细沟侵蚀的影响[J]. 水土保持研究,2018,25(03):6~10.
- [7] 苏小娟. 适用于华北地区降雨侵蚀力因子 R 的计算公式探究[J]. 山西水土保持科技,2018(04):17~19.
- [8] 温永福,高鹏,穆兴民,等. 野外模拟降雨条件下径流小区产流

产沙试验研究[J]. 水土保持研究,2018,25(01):23~29.

- [9] 安娟,于妍,吴元芝. 降雨类型对褐土横垄坡面土壤侵蚀过程的影响[J]. 农业工程学报,2017,33(24):150~156.
- [10] 邹铃莉,王云琦,王晨洋,等. 降雨类型对北方土石山区坡面土壤侵蚀的影响[J]. 农业工程学报,2017,33(24):157~164.
- [11] 高勇. 石匣小流域不同水土保持措施对土壤侵蚀影响研究[J]. 工程技术研究,2018(13):255~256.
- [12] 谢云,岳天雨. 土壤侵蚀模型在水土保持实践中的应用[J]. 中国水土保持科学,2018,16(01):25~37.
- [13] 周洋,姜敏,李梦雨,等. 湘中丘陵区紫色土坡耕地水土保持措施效益的试验研究[J]. 水土保持学报,2017,31(06):134~138.
- [14] 唐秋玮. 李子口径流域水土保持可持续发展研究[D]. 西南大学,2009.
- [15] Wischmeier W H. A rainfall erosion index for a universal soil-loss equation [J]. Soil Science Society Proceedings, 1959, 23(3): 246~249.

(上接第 22 页)

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 最佳 pH 值 6.4, 最佳接种量为 300 mL, 最佳转速为 180 r · min<sup>-1</sup> 最佳发酵温度为 30℃, 此时菌体的生长量最大, OD<sub>600</sub> 为 1.032。利用基础培养基发酵时固氮菌的 OD<sub>600</sub> 0.753, 因此优化后的培养基的发酵效率比基础培养基的发酵效率提高了 37.1%。解钾菌培养基的最优组合为甘露醇 7.5 g、牛肉膏 15 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.3 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、FeCl<sub>3</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 最佳 pH 值 7.6, 最佳接种量为 100 mL, 最佳转速为 180 r · min<sup>-1</sup> 最佳发酵温度为 34℃, 此时菌体的生长量最大, OD<sub>600</sub> 为 0.542。利用基础培养基发酵时固氮菌的 OD<sub>600</sub> 0.268, 因此优化后的培养基的发酵效率比基础培养基的发酵效率提高了 1.02%。

### 参考文献:

- [1] 苟志辉. 油茶根际功能菌株的组合优化及菌肥研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2010.
- [2] 张敏, 王正银. 生物有机肥料与农业可持续发展[J]. 磷肥与复肥, 2006, 21(2): 58~59.
- [3] 刘健, 李俊, 葛诚. 微生物肥料作用机理的研究新进展[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(1): 33~36.
- [4] 夏觅真, 马忠友, 曹媛媛, 等. 棉花根际固氮菌、解磷菌及解钾菌的相互作用[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(2): 102~105.

- [5] 康丽华. 桉树与联合固氮菌相互作用的研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(4): 14~18.
- [6] Wang X, Liu Y, Zeng G, et al. Pedological characteristics of Mn mine tailings and metal accumulation by native plants[J]. Chemosphere, 2008, 79(2): 1260~1266.
- [7] Chang C H, Yang S S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation [J]. Biore-source Technology, 2009, 100(4): 1648~1658.
- [8] 胡秀芳, 应飞翔, 陈集双. 胶质芽孢杆菌突变株 021120 的培养条件及发酵工艺优化[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 58~62.
- [9] 杨铿, 梁晓华, 杨莺莺, 等. 解磷芽孢杆菌 YC4 液体培养基及发酵条件优化[J]. 广东农业科学, 2014, 41(16): 106~111.
- [10] 李新新. 一株红壤高效解钾菌的筛选、鉴定、发酵条件优化及促生作用的研究[D]. 南京, 南京农业大学, 2013.
- [11] 伍善东, 雷平, 郭照辉, 等. 1 株高效解钾菌的分离、鉴定及培养条件优化[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(5): 77~80.
- [12] 吴海波, 王樱潼, 叶维雁, 等. 4 株番木瓜根际解磷细菌发酵条件优化研究[J]. 西南林业大学(自然科学), 2018, 38(02): 117~125.
- [13] 刘青海, 姚拓, 马从, 等. 6 株溶磷菌和 4 株固氮菌混合培养条件的研究[J]. 草原与草坪, 2011, 31(6): 1~6, 13.
- [14] 杜宇, 李来梅, 雷潇, 等. 水稻根际固氮菌 NX-2 的分离鉴定及其培养条件优化[J]. 湖南农业科学, 2017, (7): 1~3. DOI: 10.16498/j.cnki.hnnykx.2017.007.001.
- [15] 王聪, 凌娟, 张燕英, 等. 海洋固氮菌和解磷菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 817~829.