

## 一株胶冻样芽孢杆菌培养条件的优化及其解钾活性

叶伟伟, 杨晓燕, 魏善强, 张龙, 黄俊\* (山东劲牛集团股份有限公司, 山东济南 250000)

**摘要** [目的] 优化该胶冻样芽孢杆菌培养条件及测定其解钾活性。[方法] 用火焰光度计法测定胶冻样芽孢杆菌的解钾量; 通过大白菜的田间试验验证解钾功能; 通过培养基成分及培养条件的优化, 获得最佳培养基和培养条件。[结果] 用火焰光度计法测定胶冻样芽孢杆菌的解钾量为 121.3 mg/L, 其解钾率为 12.06%; 将其应用到喜钾作物大白菜上, 通过大白菜的田间试验, 与 K<sub>0</sub> (空白对照) 组相比大白菜产量增加了 15.5%, 与只加硫酸钾的 K<sub>1</sub> 相比, 产量差异不大; 通过培养基成分及培养条件的优化, 获得最佳培养基配比为蔗糖 1.0%、酵母浸粉 0.1%、硫酸镁 0.02%、磷酸氢二钾 0.05%, 最适培养条件为温度 30 ℃、pH 7.0、转速 200 r/min, 发酵结果有效活菌数达到 17.5×10<sup>8</sup> CFU/mL, 芽孢率 ≥95%, 解钾率提高到 23.02%。[结论] 该胶冻样芽孢杆菌可以将土壤中不可直接被作物吸收利用的钾素分解为作物可以直接利用的速效钾形态。

**关键词** 胶冻样芽孢杆菌; 火焰光度计法; 培养条件; 优化; 解钾率; 有效活菌数; 芽孢率

中图分类号 Q93-335 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)12-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.12.003

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Optimization of the Culture Condition of a Jelly-like *Bacillus* Strain and Its Potassium-releasing Activity

YE Wei-wei, YANG Xiao-yan, WEI Shan-qiang et al (Shandong Jinniu Biotechnology Co., Ltd., Jinan, Shandong 250000)

**Abstract** [Objective] To optimize the culture conditions of the jelly-like *Bacillus* strain and determine its potassium-releasing activity. [Method] The potassium solubilization amount of *Bacillus* jelly was determined by flame photometer; the potassium solubilization function was verified by the field test of Chinese cabbage; the best medium and culture conditions were obtained through the optimization of medium composition and culture conditions. [Result] The amount of potassium release of *Bacillus* jelly measured by flame photometer was 121.3 mg/L, and the potassium release rate was 12.06%. It was applied to the potassium-loving crop Chinese cabbage, through the field test of Chinese cabbage, compared with the K<sub>0</sub> (blank control) group, the yield of Chinese cabbage increased by 15.5%; compared with K<sub>1</sub> with only potassium sulfate, there was little difference in yield. Through the optimization of the medium composition and culture conditions, the best medium ratio was obtained sucrose 1%, yeast extract 0.1%, magnesium sulfate 0.02%, dipotassium hydrogen phosphate 0.05%, the most suitable culture conditions were temperature 30 ℃, pH 7.0, rotation speed 200 r/min, the effective number of viable bacteria reaches 17.5×10<sup>8</sup> CFU/mL as a result of fermentation, the spore rate was ≥95%, and the potassium solution rate was increased to 23.02%. [Conclusion] The *Bacillus* jelly can decompose the potassium in soil that cannot be directly absorbed by crops into quick-acting potassium forms that can be directly used by crops.

**Key words** *Bacillus* jelly; Flame photometer method; Culture condition; Optimization; Potassium solution rate; Effective number of viable bacteria; Spore rate

钾是农作物生长所必需的营养元素之一, 其以离子态或可溶性盐类被吸附在原生质表面上而存在于高等植物中, 起着促进蛋白质的合成、光合作用的进行和催化重要的酶促反应等重要作用。我国耕地土壤中蕴含着丰富的钾元素, 但 95% 的钾存在于钾长石和云母这两类矿物中, 不能被植物直接有效利用<sup>[1]</sup>。近年来随着土壤养分的失衡, 耕地中的速效钾含量也以 2 mg/(kg·a) 的速度损耗; 又因化肥的过量施用, 造成一些钾被土壤固结, 形成各种化学盐分, 在土壤中积累, 造成土壤养分结构失调、物理性状变差。钾元素已经成为农作物生长的限制因子<sup>[2-4]</sup>, 因此, 如何让土壤中含钾硅酸盐矿物转化为可被作物直接吸收利用的速效钾形态, 从而提高土壤中的速效钾含量, 成为未来农业科技研究的发展方向之一。

1939 年, 亚历山大罗夫从土壤中分离筛选出一种可以分解正长石和磷灰石并释放出钾元素和磷元素的细菌, 将其命名为硅酸盐细菌, 一些研究学者又称为钾细菌或胶质芽孢杆菌<sup>[5-6]</sup>, 后来我国一些学者把这些解钾菌统称为解钾微生物。解钾微生物 (potassium-solubilizing microorganism) 是能够在土壤或纯培养条件下, 将含钾矿物如长石、云母等不能被农作物吸收利用的矿物态钾分解产生水溶性钾的微生物<sup>[7]</sup>。

土壤中的解钾微生物在世界各地不同土壤中分布广泛, 研究报道较多的有环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 和土壤芽孢杆菌 (*B. daphicus*), 其中最常见的是胶质芽孢杆菌。胶质芽孢杆菌又称胶冻样芽孢杆菌, 一些分类学学者将胶冻样芽孢杆菌归为芽孢杆菌属, 1993 年 Ash 等<sup>[8]</sup>通过对芽孢杆菌属 51 个种的 16S rRNA 基因序列及其他相关研究发现胶冻样芽孢杆菌归为另一新属, 并命名为类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*), 因此胶冻样芽孢杆菌又称为胶冻样类芽孢杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*)。Ross 等<sup>[9]</sup>研究认为胶冻样类芽孢杆菌可以在含有钾长石粉的无氮培养基上生长, 说明胶冻样芽孢杆菌具有解钾功能。笔者前期从土壤中筛选到一株胶冻样芽孢杆菌, 通过火焰光度计法测得该菌株的解钾率, 并通过种植喜钾作物的田间试验再次验证了该菌株的解钾功能; 然后采用单因素试验和正交试验对其培养基成分、发酵工艺条件进行优化, 获得了最佳培养基及发酵条件, 并通过 50 L 发酵罐进行中试验证。

### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 供试胶冻样芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) 由山东劲牛集团股份有限公司分离并保存。矿物材料购买钾长石粉。

**1.2 培养基** 斜面培养基为无氮培养基, 其组成成分为葡萄糖 10 g/L、磷酸氢二钾 0.2 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、氯化钠

基金项目 山东省重大科技创新工程项目 (2019JZZY010712)。

作者简介 叶伟伟 (1985—), 女, 山东聊城人, 工程师, 硕士, 从事微生物研究。\* 通信作者, 高级工程师, 硕士, 从事微生物研究。

收稿日期 2021-08-30

0.2 g/L、硫酸钾 0.2 g/L、碳酸钙 5 g/L、琼脂粉 18 g/L。基础培养基为无氮培养基,其组成成分为葡萄糖 10 g/L、磷酸氢二钾 0.2 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、氯化钠 0.2 g/L、硫酸钾 0.2 g/L、碳酸钙 5 g/L。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 胶冻样芽孢杆菌菌种活化及发酵培养方法。

(1) 斜面活化培养。将-20℃保存的菌种转接到斜面培养基,30℃,培养 48 h。

(2) 摇瓶发酵培养。无菌条件下将活化好的菌种接入发酵培养基,30℃、200 r/min 振荡培养 20 h 即为种子液,同样无菌条件下,将种子液以 2% 的接种量接入 500 mL 三角瓶中,摇瓶装液量为 20%,30℃,200 r/min 振荡培养,每隔 12 h 检测一次,48 h 结束培养,重复培养 3 次。

(3) 50 L 发酵罐发酵培养。以 5% 的接种量将种子液(摇瓶发酵 20 h)接种于发酵罐中,30℃培养,转速 200 r/min,通气量为 3.3 L/min,发酵 60~72 h,芽孢率≥95% 视为发酵结束。

**1.3.2 活菌计数及芽孢率分析方法。**活菌计数采用平板计数法<sup>[10-11]</sup>,芽孢率采用芽孢染色后显微镜下计数计算。

**1.3.3 实验室解钾率的测定。**依据王珣珏等<sup>[12]</sup>解钾菌解钾效率检测方法的比较发现,经过 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消毒后,用火焰光度计所测钾含量包括菌体吸附钾、部分细胞内钾及溶液中游离钾<sup>[13]</sup>所测得的溶液中 K<sup>+</sup> 质量浓度和解钾率是 4 种处理方法中得到的结果最准确的,因此选用培养基经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后测钾的方法用火焰光度计测定该菌株的解钾能力。首先配制好系列钾标准溶液,绘制钾标准曲线,再在火焰光度计上测定待测液的速度钾含量<sup>[14]</sup>。将摇瓶发酵种子液以 2% 的接种量接种到 100 mL 含 1 g 钾长石粉的缺钾培养基中,以加入等量无菌水为空白对照,30℃,200 r/min,摇床振荡培养 7 d;取培养液 10 mL,加入 2 mL 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在沸水浴中消化 1 h;取消化液 13 000 r/min 离心 5 min,取上清在火焰光度计上测定 K<sup>+</sup> 浓度。解钾率计算公式如下:

$$\text{解钾率} = \frac{X_1 - X_0}{M \times W \times 2 \times 10^4} \times 100\% \quad (1)$$

式中, X<sub>1</sub> 为待测液速效钾含量 (mg/L); X<sub>0</sub> 为空白对照钾含量 (mg/L); M 为钾长石粉重量 (g); W 为钾长石中钾含量 (%)<sup>[15]</sup>。研究显示天然钾长石中的钾含量约为 12%<sup>[16]</sup>。

#### 1.3.4 胶冻样芽孢杆菌发酵培养条件优化。

**1.3.4.1 碳源筛选及含量优化试验。**不同碳源对不同微生物菌种发酵的影响不同,碳源选择原则是既能快速被菌体吸收利用,又能提高有效活菌数及芽孢率,但微生物工业化发酵生产中,培养基用量大,所以在选用碳源时要使用价格低廉且易于获得的碳源;因蔗糖、糖蜜、可溶性淀粉价格低廉且易制取和获得而被作为首选。该研究以培养胶冻样芽孢杆菌的经典培养基无氮培养基为基础培养基,选取常见碳源蔗糖、淀粉、糖蜜进行碳源单因子筛选及含量优化试验,见表 1。

**1.3.4.2 氮源筛选及含量优化试验。**培养基氮源有无机氮源和有机氮源 2 种,研究表明无机氮源和有机氮源在菌体发

表 1 碳源单因子筛选及含量优化试验设计

Table 1 The experimental design of carbon source single factor screening and content optimization

| 蔗糖<br>Sucrose // % | 糖蜜<br>Molasses // % | 蔗糖+淀粉<br>Sucrose + starch |
|--------------------|---------------------|---------------------------|
| 0.5                | 0.5                 | 1.0%蔗糖+0.5%淀粉             |
| 1.0                | 1.0                 | 1.0%蔗糖+1.0%淀粉             |
| 1.5                | 2.0                 |                           |
| 2.0                |                     |                           |

酵的不同阶段作用不同,在发酵前期无机氮源更有利于被菌体快速吸收利用,而有机氮源则是在菌体生长一定阶段后才被菌体重复利用<sup>[17]</sup>。该研究以培养胶冻样芽孢杆菌的经典培养基无氮培养基为基础培养基,综合原料成本及获取难易程度,选取常见氮源酵母浸粉、牛肉膏、豆粕、硫酸铵进行氮源单因子筛选及含量优化试验,见表 2。

表 2 氮源单因子筛选及含量优化试验设计

Table 2 The experimental design of nitrogen source single factor screening and content optimization

| 酵母浸粉<br>Yeast extract<br>powder // % | 豆粕<br>Soybean<br>meal // % | 硫酸铵+酵母浸粉<br>Ammonium sulfate +<br>yeast extract powder | 牛肉膏<br>Beef extract<br>% |
|--------------------------------------|----------------------------|--|--------------------------|
| 0.05                                 | 0.5                        | 0.3%硫酸铵+0.1%酵母浸粉                                       | 0.05                     |
| 0.10                                 | 1.0                        | 0.6%硫酸铵+0.1%酵母浸粉                                       | 0.10                     |
| 0.15                                 | 1.5                        | 1.0%硫酸铵+0.1%酵母浸粉                                       | 0.15                     |

**1.3.4.3 温度、初始 pH 及转速发酵条件优化试验。**培养温度、初始 pH 及转速是影响菌株生长的主要条件,利用单因素试验确定培养基最佳培养条件,试验设计见表 3。

表 3 发酵条件单因素试验设计

Table 3 Single-factor experiment design of fermentation conditions

| 温度<br>Temperature // °C | 初始 pH<br>Initial pH | 转速<br>Rotating speed // r/min |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
| 28                      | 6.0                 | 140                           |
| 30                      | 6.5                 | 160                           |
| 32                      | 7.0                 | 180                           |
| 34                      | 7.5                 | 200                           |
| 37                      | 8.0                 | 220                           |

**1.3.5 正交试验。**利用单因素试验确定的最佳碳源、氮源和中心水平,选取蔗糖、酵母浸粉、硫酸镁和磷酸氢二钾含量进行 4 因素 3 水平正交试验,获得最优发酵配方,正交试验因素和水平见表 4。

**1.3.6 发酵罐试验。**采用正交试验获得的最佳培养基配方及单因素试验确定的最佳发酵工艺条件,以 5% 的接种量将种子液接种于装液量为 70% 的 50 L 发酵罐中,30℃培养,转速 200 r/min,通气量为 3.3 L/min,48 h 发酵结束,发酵液离心再进行喷雾干燥得到菌粉,测定相关指标及单位浓度内菌的解钾活性。

**1.3.7 田间试验。**选取喜钾作物大白菜为试验材料,品种为西星秋王。试验地土壤类型为褐土、表层质地为轻壤,土壤肥力较高,排灌条件良好。试验设 4 个处理,处理①(K<sub>0</sub>),空

白处理即不施加任何东西;处理②( $K_1$ ),不加菌液加硫酸钾;处理③( $K_2$ ),加菌液不加硫酸钾;处理④( $K_3$ ),加菌液加硫酸钾。每个处理重复3次,每个处理的小区面积为45 m<sup>2</sup>,随机排列,小区设立保护行2 m;网室栽培,定期浇水,保持试验田湿度,网室有遮雨篷防止因下雨而导致养分流失。试验时间8月1日至10月31日。试验期间田间管理措施一致,白菜采收按小区单独采收、称重、计产。

表4 正交试验因素和水平

Table 4 Factors and levels of orthogonal test

| 水平<br>Level | 因素 Factor           |                                       |                                   |   |
|-------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|
|             | A(蔗糖<br>Sucrose//%) | B(酵母浸粉<br>Yeast extract<br>powder//%) | C(硫酸镁<br>Magnesium<br>sulfate//%) | D(磷酸氢二钾<br>Dipotassium<br>phosphate//%) |
| 1           | 0.5                 | 0.05                                  | 0.02                              | 0.05                                    |
| 2           | 1.0                 | 0.10                                  | 0.04                              | 0.10                                    |
| 3           | 1.5                 | 0.15                                  | 0.06                              | 0.15                                    |

## 2 结果与分析

**2.1 实验室解钾率测定** 将菌株种子液接种到以钾长石粉为唯一钾源的培养基中,振荡培养7 d后,取培养液经6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消化处理,测定该菌株的解钾量为121.3 mg/L,空白对照组解钾量为1.5 mg/L,计算可得其解钾率为12.06%。

### 2.2 胶冻样芽孢杆菌发酵培养条件优化

**2.2.1 碳源筛选及含量优化。**有研究表明,可溶性淀粉、糖蜜有利于菌体生长和芽孢的形成,而蔗糖有利于菌体生长但抑制芽孢形成<sup>[18]</sup>。从表5可以看出,随着蔗糖添加量的增多,有效活菌数并没有随之增多,反而下降,虽然蔗糖有利于菌体生长,但是大量的蔗糖也抑制了芽孢的形成,从而降低了菌的存活率,所以随着蔗糖添加量的增多,有效活菌数没有一直增多,反而下降。随着糖蜜添加量的增多,有效活菌数增多,但1.0%和2.0%糖蜜的添加量的有效活菌数并没有显著区别,而且在添加量相同的情况下,添加糖蜜的有效活菌数和芽孢数均低于添加蔗糖的有效活菌数和芽孢数,所以添加蔗糖优于糖蜜;选取最优1.0%蔗糖添加量和不同比例淀粉组合作为复合碳源的有效活菌数和芽孢数也低于单独添加蔗糖的有效活菌数和芽孢数,综合有效活菌数和芽孢形成情况,选取最佳碳源为蔗糖,1.0%为最佳用量进行下一步试验。

**2.2.2 氮源筛选及含量优化。**从表6可以看出,除豆粕外,酵母浸粉、硫酸铵、牛肉膏这几种氮源对胶冻样芽孢杆菌芽孢的形成影响并不大。当分别用酵母浸粉、豆粕、牛肉膏作为单一氮源时,酵母浸粉作为单一氮源的有效活菌数均高于其他2种单一氮源,尤其是酵母浸粉添加量为0.10%时,有效活菌数最高(8.5×10<sup>8</sup> CFU/mL),也均高于0.10%酵母浸粉和不同比例硫酸铵组合作为复合氮源的有效活菌数。综合芽孢形成情况、成本等因素,选取最佳氮源为酵母浸粉及其添加量为0.10%进行下一步试验。

**2.2.3 温度、初始pH及转速发酵条件优化。**由图1可知,该胶冻样芽孢杆菌在30℃培养时有效活菌数最多(9.2×

表5 碳源筛选及含量优化试验结果

Table 5 Carbon source screening and content optimization test results

| 序号<br>No. | 碳源<br>Carbon source | 有效活菌数<br>Number of effective<br>viable bacteria<br>×10 <sup>8</sup> CFU/mL | 芽孢形成情况<br>Spore formation |
|-----------|---------------------|--|---------------------------|
| 1         | 0.5%蔗糖              | 1.9  | 90%                       |
| 2         | 1.0%蔗糖              | 5.6  | ≥95%                      |
| 3         | 1.5%蔗糖              | 2.9  | 35%                       |
| 4         | 2.0%蔗糖              | 1.5  | 30%                       |
| 5         | 0.5%糖蜜              | 1.37   | 70%                       |
| 6         | 1.0%糖蜜              | 2.42   | 80%                       |
| 7         | 2.0%糖蜜              | 2.60   | 83%                       |
| 8         | 1.0%蔗糖+0.5%淀粉       | 1.51   | 少量                        |
| 9         | 1.0%蔗糖+1.0%淀粉       | 1.30   | 少量                        |

表6 氮源筛选及含量优化试验结果

Table 6 Nitrogen source screening and content optimization test results

| 序号<br>No. | 氮源<br>Nitrogen source | 有效活菌数<br>Number of effective<br>viable bacteria<br>×10 <sup>8</sup> CFU/mL | 芽孢形成<br>情况<br>Spore<br>formation |
|-----------|-----------------------|--|----------------------------------|
| 1         | 0.05%酵母浸粉             | 4.7  | 90%                              |
| 2         | 0.10%酵母浸粉             | 8.5  | ≥95%                             |
| 3         | 0.15%酵母浸粉             | 5.1  | 95%                              |
| 4         | 0.5%豆粕                | 2.1  | 未形成                              |
| 5         | 1.0%豆粕                | 3.2  | 未形成                              |
| 6         | 1.5%豆粕                | 3.4  | 未形成                              |
| 7         | 0.3%硫酸铵+0.10%酵母浸粉     | 5.5  | 90%                              |
| 8         | 0.6%硫酸铵+0.10%酵母浸粉     | 5.9  | 90%                              |
| 9         | 1.0%硫酸铵+0.10%酵母浸粉     | 5.1  | 90%                              |
| 10        | 0.05%牛肉膏              | 3.6  | 90%                              |
| 11        | 0.10%牛肉膏              | 2.8  | 92%                              |
| 12        | 0.15%牛肉膏              | 2.3  | 92%                              |

10<sup>8</sup> CFU/mL),同一发酵周期内较37℃培养时有效活菌数(3.2×10<sup>8</sup> CFU/mL)高出65%,试验得出的该培养温度与赫玲玲等<sup>[19]</sup>解钾胶冻样芽孢杆菌的液态发酵培养基及条件优化中的培养温度(37℃)不同,经分析可知,其发酵初期的温度是在28~32℃,发酵后期温度升至37℃,是因为在较高发酵温度下菌体易形成芽孢,所以胶冻样芽孢杆菌菌体生长增殖期和芽孢形成期的温度不同,与赵志浩等<sup>[1]</sup>的胶质芽孢杆菌的发酵工艺研究和田间应用结果相符,也说明相同菌种不同的培养目的有不同的发酵温度<sup>[20]</sup>。

由图2可知,不同的初始pH对菌种的发酵结果有不同的影响,但是合适的初始pH可以缩短菌体的生长周期,加快菌体的生长繁殖速度<sup>[21]</sup>。当培养基初始pH在6.0、6.5的弱酸性环境时,有效活菌数相对较低,当培养基初始pH在7.0~8.0中性至弱碱环境时,有效活菌数增加,初始pH在7.5时,有效活菌数最高,为8.9×10<sup>8</sup> CFU/mL,由此可得出该胶冻样芽孢杆菌适合在中性至弱碱性条件下生长。

有研究表明,胶质芽孢杆菌为好氧菌,且临界氧浓度也很高,不同的转速会有不同的通气量,因此转速也是影响胶冻样芽孢杆菌菌量的重要因素<sup>[22]</sup>。从图3可以看出,在一定范围内,胶冻样芽孢杆菌的菌量随着转速的增加而增加,在

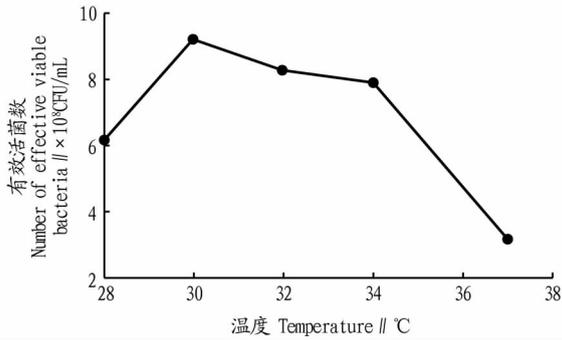


图1 温度对胶冻样芽孢杆菌菌量的影响

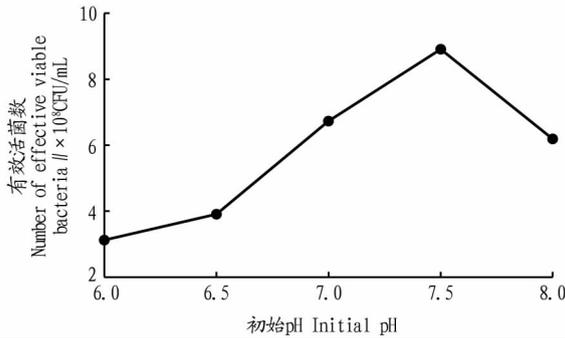
Fig.1 Effect of temperature on the amount of *Bacillus* jelly bacteria

图2 初始pH对胶冻样芽孢杆菌菌量的影响

Fig.2 Effect of initial pH on the amount of *Bacillus* jelly bacteria

200 r/min的转速下,菌量最高,为 $9.1 \times 10^8$  CFU/mL,但是在200~220 r/min的转速下,菌量随着转速的增加而降低,由此可以得出该胶冻样芽孢杆菌的最适转速为200 r/min。

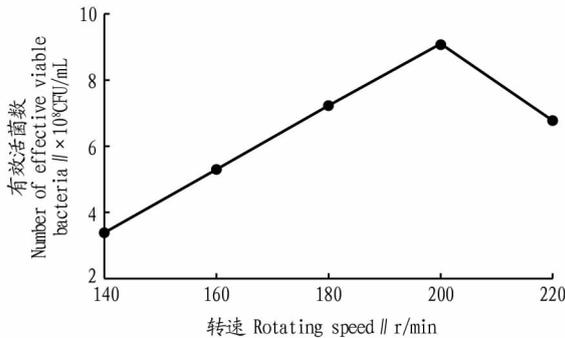


图3 转速对胶冻样芽孢杆菌菌量的影响

Fig.3 Effect of rotating speed on the amount of *Bacillus* jelly bacteria

**2.3 正交试验** 根据单因素试验的结果,选取蔗糖、酵母浸粉、硫酸镁、磷酸氢二钾进行4因素3水平正交试验,正交试验结果见表7,从正交试验的结果分析可知,影响胶冻样芽孢杆菌发酵总菌数的因素由主到次依次为A(蔗糖)>B(酵母浸粉)>C(硫酸镁)>D(磷酸氢二钾);培养基的最佳组合是 $A_2B_2C_1D_1$ ,即蔗糖1.0%、酵母浸粉0.10%、硫酸镁0.02%、磷酸氢二钾0.05%,并在最佳配比条件下进行了3次验证试验,有效活菌数平板计数结果显示总菌数平均为 $17.5 \times 10^8$  CFU/mL,比优化前( $16.5 \times 10^8$  CFU/mL)提高了6.1%。

表7 正交试验结果

Table 7 Orthogonal test results

| 试验号<br>Test<br>No. | A      | B      | C      | D      | 有效活菌数<br>Number of effective viable<br>bacteria//×10 <sup>8</sup> CFU/mL |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--|
| 1                  | 1      | 1      | 1      | 1      | 6.899  |
| 2                  | 1      | 2      | 2      | 2      | 6.233  |
| 3                  | 1      | 3      | 3      | 3      | 0.351  |
| 4                  | 2      | 1      | 2      | 3      | 9.722  |
| 5                  | 2      | 2      | 3      | 1      | 11.733   |
| 6                  | 2      | 3      | 1      | 2      | 5.285  |
| 7                  | 3      | 1      | 3      | 2      | 7.156  |
| 8                  | 3      | 2      | 1      | 3      | 10.788   |
| 9                  | 3      | 3      | 2      | 1      | 7.089  |
| $K_1$              | 13.483 | 24.100 | 24.580 | 23.790 |  |
| $K_2$              | 26.740 | 26.823 | 22.400 | 21.250 |  |
| $K_3$              | 25.033 | 15.300 | 19.240 | 21.183 |  |
| R                  | 13.257 | 11.523 | 5.340  | 2.607  |  |

**2.4 发酵罐发酵** 在正交试验获得的最佳培养基配方及单因素试验确定的最佳发酵工艺条件的基础上,进行50 L发酵罐发酵试验。试验以5%的接种量,pH 7.0~8.0,转速200 r/min,通气量为3.3 L/min,30 °C培养,发酵时长为72 h,每12 h取一次样,平板计数法测总菌数,油镜下观察芽孢大小状态及脱落情况。由图4可知,发酵至48 h有效活菌数最高,此后,随着时间的延长,有效活菌数逐渐减少;在油镜观察下,在发酵24 h取样镜检时,发现有菌体形状大小整齐,有孢囊出现,48 h镜检时,55%左右的芽孢脱落,大小一致,同步率95%左右,因此,在此次试验优化的培养基及培养条件下,该胶冻样芽孢杆菌在未补料且单批次发酵培养的发酵周期为48 h左右,如需一定的有效活菌数和芽孢率,还需要进行补料试验或再次优化培养条件,以达到工业化生产需求。通过火焰光度计法再次测定优化培养基后培养的该菌的解钾量为231.5 mg/L,空白对照组解钾量为1.5 mg/L,计算可得单位浓度内该菌的解钾率为23.02%,说明优化培养基和培养条件后单位浓度内的有效活菌数增多,所以再次测定单位浓度菌的解钾率提高了。

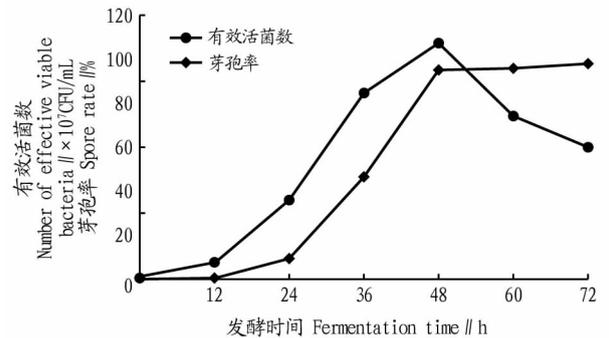


图4 发酵罐发酵试验结果

Fig.4 Fermentation test results of the fermenter

**2.5 田间试验** 该研究通过田间试验观察解钾菌对植物生长的影响。8月1日进行田间试验并观察大白菜生长期内的生物学性状,包括株高、单株重、球茎大小,10月31日采收,统计各小区产量,结果如表8所示。

根据表8中数据,分别对 $K_0$ 与 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 在株高、单株重、球茎和小区产量方面进行单样本双侧t检验,结果显示,

株高、单株重、球茎和小区产量均在 0.05 水平差异显著。K<sub>1</sub> 与 K<sub>0</sub> 相比,在株高、单株重、球茎和小区产量上均高于 K<sub>0</sub>,可见 K<sub>1</sub> 中大白菜利用了硫酸钾中的钾素,提高了大白菜产量;K<sub>2</sub> 比 K<sub>1</sub> 在株高、单株重、球茎和小区产量上均有所提高,且 K<sub>1</sub> 施加硫酸钾,K<sub>2</sub> 未施加硫酸钾,说明 K<sub>2</sub> 施加的菌液有效促进了土壤中钾素的利用,使 K<sub>2</sub> 组中大白菜产量明显提高。从表 8 还可以看出,K<sub>3</sub> 在株高、单株重、球茎和小区产量上均比施加了硫酸钾的 K<sub>1</sub> 有明显提高,从而也可以得出 K<sub>3</sub> 中施加的菌液提高了土壤中钾素的利用率;而且在实验室中应用火焰光度计也测出了该菌的解钾量,综上所述可以得出该胶冻样芽孢杆菌具有解钾功能,可以使土壤中不可被直接吸收利用的钾素形态分解为大白菜可以吸收利用的速效钾形态,使得大白菜在生长过程对钾素的需求得到满足。

表 8 大白菜田间试验结果  
Table 8 Chinese cabbage field test results

| 处理<br>Treatment | 株高<br>Plant height<br>cm | 单株重<br>Weight per<br>plant/kg | 球茎<br>Corm<br>cm | 小区产量<br>Plot yield<br>kg |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------|
| K <sub>3</sub>  | 37.2                     | 3.41                          | 17.8             | 478.1                    |
| K <sub>2</sub>  | 33.6                     | 2.28                          | 16.6             | 449.4                    |
| K <sub>1</sub>  | 27.3                     | 2.21                          | 16.1             | 445.1                    |
| K <sub>0</sub>  | 26.8                     | 2.08                          | 15.0             | 413.9                    |

### 3 讨论与结论

胶冻样芽孢杆菌根据不同来源、不同贮藏条件及不同的研究目的,其发酵培养基配方和发酵条件不同<sup>[23]</sup>,发酵结果也会存在一定的差异。该研究对胶冻样芽孢杆菌液体培养基的碳源、氮源种类进行了单因素含量优化试验,对发酵最适温度、最佳 pH、最适转速进行了优化试验,并且依据单因素和发酵条件优化的试验结果,进行了 4 因素 3 水平的正交试验,正交试验结果显示最佳培养基配比为蔗糖 1.0%、酵母浸粉 0.10%、硫酸镁 0.02%、磷酸氢二钾 0.05%,发酵结果测得有效活菌数为 17.5×10<sup>8</sup> CFU/mL,结果比优化前提高了 6.1%,且发酵结果比王金玲等<sup>[24]</sup>进行发酵条件优化后有效活菌数达到 3.47×10<sup>8</sup> CFU/mL、吴向华等<sup>[22]</sup>对发酵条件优化后有效活菌数达到 9.58×10<sup>8</sup> CFU/mL 都有一定程度的提高。

该研究选用培养基经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后测钾的方法,经测定该胶冻样芽孢杆菌的解钾率为 12.06%,通过对其培养基和培养条件优化后,再次测定单位浓度内该菌的解钾率提高到 23.02%,但与李海龙等<sup>[25]</sup>从土壤中分离的芽孢杆菌 QL21 的解钾率为 25.1%、赵飞等<sup>[26]</sup>从钾矿物表面分离筛选出来的 2 株菌的解钾率分别为 29.8%、25.4%相比,该菌株的解钾能力仍存在一定的差距,因此需要进一步驯化、改良该菌株的解钾能力;与贺积强等<sup>[27]</sup>从紫色土壤中分离筛选出的 40 株解钾菌的解钾率为 0.66%~7.90%相比,该菌株的解钾能力也具有较大的优势。由此可知,不同的菌株及处于不同生境的解钾菌,因其生态演化机制不同,其解钾能力也不同,解钾量也是有限的,因此分离、筛选出高效解钾菌株或者通过基因工程及诱变育种等技术手段获得高繁殖力、高解钾能力的优良

菌株是今后解钾菌的研究方向之一。

综上所述可知该胶冻样芽孢杆菌具有一定的解钾能力,如果实现生产含有该菌的生物菌肥并将其应用到农业生产,为土壤提供充足的钾素,满足农作物生长,还需要进行进一步优化和改良该菌株。

### 参考文献

- [1] 赵志浩,徐银荣,邱乐.胶质芽孢杆菌的发酵工艺研究和田间应用[J].湖南农业科学,2004(5):34-37.
- [2] ABD-ALLA M H.Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae [J].Letters in applied microbiology, 1994, 18(5):294-296.
- [3] TAO G C, TIAN S J, CAI M Y, et al.Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils [J].Pedosphere, 2008, 18(4):515-523.
- [4] 刘荣昌,李凤汀,郝正然,等.生物钾肥在农业生产中的应用[M]//葛诚.微生物肥料的生产应用及其发展.北京:中国农业出版社,1996:66-74.
- [5] 蒋先军,黄昭贤,彭盛德,等.硅酸盐细菌的研究现状及展望[J].世界农业,1998(5):28-31.
- [6] 亚历山罗夫 B T.硅酸盐细菌[M].叶维青,译.北京:科学出版社,1995.
- [7] 张爱民,李乃康,赵钢勇,等.土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J].河北大学学报(自然科学版),2015,35(4):442-448.
- [8] ASH C, PRIEST F G, COLLINS M D.Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test [J].Antonie van leeuwenhoek, 1993, 64(3/4):253-260.
- [9] ROSS N, VILLEMUR R, MARCANDELLA É, et al.Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm [J].Microbial ecology, 2001, 42(1):56-68.
- [10] 张日俊.微生态制剂的质量鉴别与选择、检测指标和标准[J].饲料工业,2010,31(20):1-4.
- [11] 刘宝生,余占桥.一株高度黏连的枯草芽孢杆菌的活菌计数[J].黑龙江畜牧兽医,2011(9):19-21.
- [12] 王珣珺,黄巧云,蔡鹏,等.解钾菌解钾效率检测方法的比较[J].华中农业大学学报,2016,35(1):81-85.
- [13] 彭钰媛,易浪波,彭清忠,等.亚硝基胍与紫外诱变选育高效解钾菌株[J].吉首大学学报(自然科学版),2016,37(6):62-67.
- [14] 王明兆,薛莉,周鹤,等.火焰发射光谱法精确测定化肥中钾的含量[J].仪器仪表与分析监测,2004(2):36-38.
- [15] 谷付旗,李秀玲,魏云林.土壤硅酸盐细菌的研究进展[J].中国微生态学杂志,2013,25(5):609-611,616.
- [16] 张妙宜,陈宇丰,周登博,等.蓖麻根际土壤解钾菌的筛选鉴定及发酵条件的优化[J].热带作物学报,2016,37(12):2268-2275.
- [17] 李东华,杨博.响应面法优化胶质芽孢杆菌 GM1 增殖发酵培养基[J].食品工业科技,2012,33(22):206-209.
- [18] PETRY S, FURLAN S, CREPEAU M J, et al.Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium [J].Applied and environmental microbiology, 2000, 66(8):3427-3431.
- [19] 赫玲玲,程顺利,肖进彬,等.解钾胶冻样芽孢杆菌的液态发酵培养基及条件优化[J].河南科学,2020,38(7):1075-1082.
- [20] 易浪波,彭清忠,何齐庄,等.高效钾长石分解菌株的筛选、鉴定及解钾活性研究[J].中国微生态学杂志,2012,24(9):773-776,785.
- [21] 闫龙翔,贾小红,李芳柏,等.获取生物肥料中高活性胶冻样芽孢杆菌的发酵工艺:CN200610148335.3[P].2008-07-02.
- [22] 吴向华,刘五星.胶冻样芽孢杆菌培养条件及发酵工艺的优化[J].江苏农业科学,2006,34(4):155-158.
- [23] 王波,王幸,周兴根,等.多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) XZ-2 发酵条件优化的研究[J].江西农业学报,2018,30(11):57-61.
- [24] 王金玲,赵凤艳,吕长山,等.胶质芽孢杆菌液体发酵产孢培养基的优化[J].食品与生物技术学报,2013,32(4):417-424.
- [25] 李海龙,谷洁,张宏斌,等.秦岭南山区硅酸盐细菌的分离、筛选以及初步鉴定[J].西北农业学报,2011,20(4):194-199.
- [26] 赵飞,盛下放,黄智,等.山东地区钾矿物分解细菌的分离及生物学特性[J].生物多样性,2008,16(6):593-600.
- [27] 贺积强,李登煜,张小平,等.紫色土硅酸盐细菌的表型特征及溶磷解钾能力[J].应用与环境生物学报,2003,9(1):71-77.