

以杜仲叶渣为载体固态发酵制备解磷生物肥料的工艺优化

张昌伟 彭 胜 张琳杰 王志宏 周云雷 彭密军*

(吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室 杜仲湖南省工程实验室 湖南 张家界 427000)

摘要:以杜仲叶渣为载体,巨大芽孢杆菌为发酵菌种,以其活菌数为指标,通过正交试验考察了杜仲叶渣固态发酵制备解磷生物肥料的最佳工艺条件。结果表明,杜仲叶渣制备解磷生物肥料的最佳工艺条件为:料液比(质量和体积比)1:2.5,料层厚度6 cm,接种量(每毫升细菌数量为 8.56×10^9 个)1.5 mL,发酵温度30 ℃,杜仲叶渣与倍花废渣的质量比为1:0.4。此培养条件下巨大芽孢杆菌的最大活菌数可达 1.64×10^9 cfu/g。此外,由最佳工艺条件制备的解磷生物肥料,其相关指标均在国标限量内。因此,杜仲叶渣可以作为一种良好的载体来制备解磷生物肥料。

关键词:杜仲叶渣;巨大芽孢杆菌;解磷生物肥料;固态发酵

中图分类号:S446.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2006(2014)05-0134-05

Research on technological conditions of SSF to prepare phosphate-soluble biological fertilizer with leaves residual of *Eucommia ulmoides* Olive as carrier

ZHANG Changwei, PENG Sheng, ZHANG Linjie, WANG Zhihong, ZHOU Yunlei, PENG Mijun*

(Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Hunan Engineering Laboratory for *Eucommia ulmoides* Olive, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;)

Abstract: In order to research optimal technological conditions of solid-state fermentation to prepare phosphate-soluble biological fertilizer, the leaves residual of *Eucommia ulmoides* Olive as carrier, *Bacillus megaterium* as fermented culture and viable count as index were employed by using the orthogonal test. The results showed that optimal technological conditions of phosphate-soluble biological fertilizer prepared by leaves residual of *E. ulmoides* Olive was as follows: ratio of liquor to material was 1:2.5, substrate thickness was 6 cm, the amount of inoculum was 1.5 mL, temperature was 30 ℃, and the mass ratio of leaves residual of *E. ulmoides* Olive and waste slag of floraphis was 1:0.4. The maximum viable count of *B. megaterium* could reach 1.64×10^9 cfu/g at aforesaid experimental condition. In addition, contents of related indices of the phosphate-solubilizing biological fertilizer prepared by optimal technological conditions were all within the range of national standard. As a result, leaves residual of *E. ulmoides* Olive could be used as carrier to prepare biological fertilizer.

Key words: leaves residual of *Eucommia ulmoides* Olive; *Bacillus megaterium*; phosphate-solubilizing biological fertilizer; solid-state fermentation

我国是一个农业大国,缺磷的土地面积较大,约占总耕地面积的三分之二^[1]。磷作为作物生长所需的三大营养要素之一,在核酸、核苷酸和磷脂等化合物的合成中起着重要作用^[2-3]。由于土壤中可以被植物直接吸收利用的磷含量极低,难以满足植物生长的需要^[4],因此,我国过去主要是通过

大量施用磷肥来改善土壤中磷的状况。但是,所施用磷肥中的大部分磷与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 结合,形成了难溶性磷酸盐,反而导致了土壤板结、水体富营养化等问题的出现^[5-6],寻找一种能从根本上缓解我国土壤缺磷状况的绿色环保肥料迫在眉睫。解磷生物肥料正是这种肥料的优先

收稿日期:2013-01-26

修回日期:2013-09-08

基金项目:湖南省教育厅高校产业化培育项目(11Y015,12CY014);湖南省教育厅资助项目(13C758);吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室开放项目(JDLC201208);吉首大学校级科研项目(Jd12040)

第一作者:张昌伟,硕士生。*通信作者:彭密军,教授。E-mail: pengmj163@163.com。

引文格式:张昌伟,彭胜,张琳杰,等.以杜仲叶渣为载体固态发酵制备解磷生物肥料的工艺优化[J].南京林业大学学报:自然科学版,2014,38(5):134-138.

选择,它可以通过其中的解磷生物将土壤中难溶磷转化为有效磷,促进磷素释放,改善作物磷素营养^[7-8]。解磷生物肥料由载体和解磷微生物两部分组成,常见的载体有土壤、硅藻土、蛭石、菌糠等^[9-10]。目前,有许多学者利用废弃物作为载体制备生物肥料,并且均取得了较好的效果^[11-13]。杜仲叶渣作为杜仲叶经提取有效成分后的废弃物,对其研究主要集中于食用菌的栽培上,而利用杜仲叶渣制备生物肥料的研究少见报道^[14-15]。笔者利用杜仲叶渣作为载体制备解磷生物肥料,期望为杜仲叶渣的高值化利用提供一定的理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂和设备

杜仲叶渣由张家界恒兴生物科技有限公司提供,倍花废渣由张家界奥威科技有限公司提供,巨大芽孢杆菌购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。氯化钾和磷酸二氢钾为优级纯;蛋白胨、牛肉提取物、琼脂、氯化钠、焦磷酸钠、氢氧化钠、重铬酸钾、浓硫酸、硫酸亚铁、邻菲罗啉、过氧化氢、硼酸、甲基红、溴甲酚绿、硝酸、钼酸铵、偏钒酸铵、二硝基酚、柠檬酸等均为国产分析纯。

UV-3900 紫外可见分光光度计,日立高新技术公司;AA-680 原子吸收光谱仪、SM-52 高压蒸汽灭菌器、AEG-220 型万分之一天平,日本岛津公司;BM400 型数显电热恒温水浴锅,日本 YAMATO;GZX-9146 MBE 型数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;无菌操作台,苏净集团安泰公司;BS-2E 恒温振荡培养箱,常州中捷试验仪器制造有限公司;SPX 智能型生化培养箱,宁波江南仪器厂;KDN-AZ 智能型定氮仪,上海新嘉电子有限公司。

1.2 杜仲叶渣相关成分含量的测定

取晒干后的杜仲叶渣进行粉碎,过孔径 0.28 mm 筛,按四分法取样,装入自封袋后放于冰箱中保存备用。蛋白质和全氮的测定采用凯氏定氮法,参照 GB 5009.5—2012《食品中蛋白质的测定》;速效磷和全磷的测定采用紫外分光光度法,分别参照 NY/T 300—1995《有机肥料速效磷的测定》和 GB 5413.22—2010《婴幼儿食品和乳品中磷的测定》;全钾和速效钾的测定采用火焰原子吸收分光光度法,分别参照 GB 5413.22—2010《婴幼儿食品和乳品中钙、铁、钠、锌、钾、镁、铜和锰的测定》和 NY/T 301—1995《有机肥料速效钾的测定》;腐殖酸的测定采用滴定法^[12]。

1.3 杜仲叶渣和倍花废渣的预处理

将杜仲叶渣晒干、粉碎、过孔径 0.28 mm 筛,倍花废渣(一种五倍子经提取有效成分后的废弃物,其中含有一定量的蛋白质、磷、钾等成分,但是由于其颗粒较大,难以以为微生物提供直接的营养需求,故可只看作疏松剂)晒干、碾碎,过孔径 0.42 mm 筛。

1.4 菌种的扩大培养

取 250 mL 锥形瓶装入 100 mL 巨大芽孢杆菌液体培养基,将巨大芽孢杆菌接种于锥形瓶中,于 30 ℃,110 r/min 振荡培养 96 h。此时菌悬液的活菌数为 8.56×10^9 个/mL。

1.5 解磷生物肥料的工艺优化

选择巨大芽孢杆菌的活菌数作为指标,接种量、料液比、温度、料层厚度以及杜仲叶渣与倍花废渣的质量比作为考察因素进行单因素正交试验,将杜仲叶渣与倍花废渣按一定的比例混合,然后称取一定量的混合载体放入 250 mL 的锥形瓶中,加入一定量的巨大芽孢杆菌液体培养基,用无菌封口膜封口,高压灭菌 30 min,然后接入一定量的扩大培养的巨大芽孢杆菌液体菌种,置于一定温度的恒温培养箱中培养,每隔 20 h 取样一次,测定其中的巨大芽孢杆菌活菌数。

1.6 解磷生物肥料的相关成分测定

取一定量的由杜仲叶渣最佳工艺制备的解磷生物肥料,测定其中的水分、有机质、腐殖酸、全氮、全磷、全钾,以及重金属汞、铬、镉、铅、砷的含量。其中,水分的测定参照 GB/T 5009.3—2010《食品中水分的测定》;有机质的测定参照 NY/T 1121.6—2006《土壤有机质的测定》;重金属汞、铬、镉、铅、砷的测定参照 NY/T 1978—2010《肥料汞、砷、镉、铅、铬含量的测定》;全氮、全磷、全钾、腐殖酸的测定根据凯氏定氮法、紫外光光度法、原子吸收分光光度法及滴定法。

2 结果与分析

2.1 杜仲叶渣相关成分含量的测定结果

对杜仲叶渣相关成分的测定结果表明,其中全氮 2.074%、全磷 2.262 g/kg、全钾 0.714 3 g/kg、速效磷 0.886 1 g/kg、速效钾 0.258 1 g/kg、腐殖酸 16.12%、蛋白质 12.96%、可溶性总糖 3.195%,这些物质可为微生物的生长提供充足的碳源、氮源,以及一定量的微量元素。此外,杜仲叶渣具有一定的吸附能力,因此,杜仲叶渣具有作为载体制备生物肥料的潜力。

2.2 不同因素对杜仲叶渣制备解磷生物肥料的影响

2.2.1 料液比

称取杜仲叶渣 20 g,放入 250 mL 锥形瓶中。将料液比(液体是巨大芽孢杆菌液体培养基,下同)分别设为 1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:3.5,杜仲叶渣与倍花废渣的质量比为 1:0.2,接种量(菌悬液浓度为 8.56×10^9 个/mL,下同) 1.5 mL,料层厚度 4 cm,培养温度 30 °C,考察其对巨大芽孢杆菌发酵的影响,试验结果见图 1A。从图 1A 可知,当料液比为 1:1.5 时,菌体生长较为缓慢,达到最高活

菌数的时间延长,这可能是因为加入的培养液较少使得发酵基质中的营养成分含量较低,影响了菌体的大量繁殖;当料液比为 1:2.0~1:3.5 时,随着料液比不断增大,在相同的发酵时间下,菌体的活菌数先增加后减少,并且,各组菌体在 60 h 均可达到最高活菌数,其中,当料液比为 1:2.5 时,菌体在 60 h 的活菌数为所有组别中最高。这可能是因为料液比在一定的范围内时,充足的营养有利于菌体的快速生长繁殖,而料液比过大会使发酵基质中的水分含量过高,影响正常的散热和通气,不利于菌种的快速生长繁殖,故最佳料液比应选择 1:2.5。

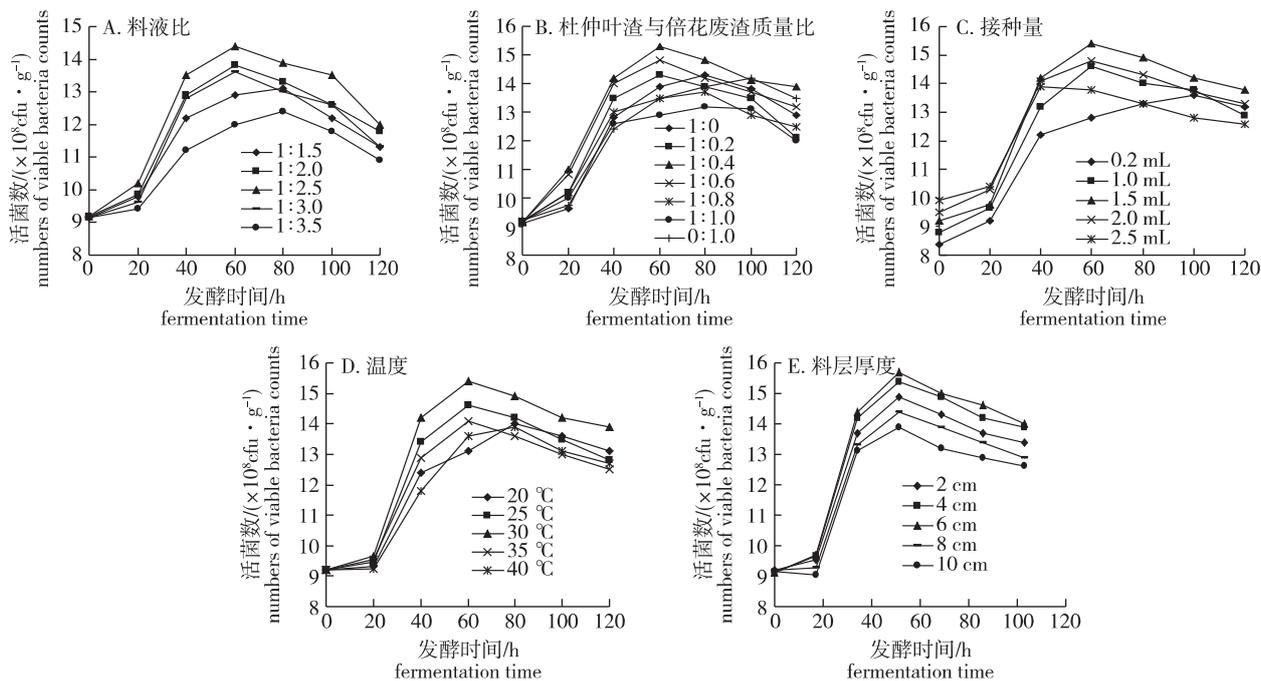


图 1 不同因素处理对活菌数的影响

Fig. 1 Effect of different factors on the numbers of viable bacteria counts

2.2.2 杜仲叶渣与倍花废渣的质量比

称取杜仲叶渣 20 g,放入 250 mL 锥形瓶中。固定料液比为 1:2.5,接种量 1.5 mL,料层厚度 4 cm,培养温度 30 °C,将杜仲叶渣与倍花废渣的质量比分别设为 1:0、1:0.2、1:0.4、1:0.6、1:0.8、1:1.0、0:1.0,考察其对巨大芽孢杆菌发酵的影响,试验结果见图 1B。从图 1B 可知,当完全利用杜仲叶渣作为发酵基质进行发酵时,菌体生长较为缓慢,在 80 h 才达到最高活菌数。这可能是因为粉碎后的杜仲叶渣颗粒比较小,加入液体培养基后会使得杜仲叶渣颗粒间的孔隙度变得更加狭小,不利于菌种的呼吸作用,从而影响菌体的快速生长繁殖。当倍花废渣与杜仲叶渣的质量比在 0.2~0.6 之间时,菌体活菌数均可在 60 h 时达到最高值,其中,

当倍花废渣与杜仲叶渣的质量比为 0.4 时,菌体在 60 h 的活菌数为所有组别中的最高值。这可能是因为碾碎后的倍花废渣颗粒较大,通过添加适量的倍花废渣可以使发酵基质中的孔隙度在一个有利于菌体呼吸和发酵基质散热的范围内,从而促使菌体快速生长繁殖。随着倍花废渣添加量的继续增加,菌体达到最高活菌数的时间也出现了延迟,并且当完全利用倍花废渣作为发酵基质进行发酵时,菌体在 100 h 才达到最高活菌数。这是因为添加过量的倍花废渣会使发酵基质过于蓬松,导致散热太快,不利于菌体的正常生长繁殖。因此,杜仲叶渣与倍花废渣的质量比最佳为 1:0.4。

2.2.3 接种量

称取杜仲叶渣 20 g,放入 250 mL 锥形瓶中。

固定料液比为 1:2.5,杜仲叶渣与倍花废弃物的质量比为 1:0.4,料层厚度 4 cm,培养温度 30 °C,将接种量分别设为 0.2、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,考察接种量对巨大芽孢杆菌发酵的影响,试验结果见图 1C。从图 1C 可知:当接种量为 0.2 mL 时,菌体生长比较缓慢,在 100 h 才达到最高活菌数;当接种量为 1.0 ~ 2.0 mL 时,菌体在 60 h 即可达到最高活菌数,其中,当接种量为 1.5 mL 时,菌体在 60 h 的活菌数为所有组别中最高;当接种量增大至 2.5 mL 时,菌体在 40 h 即可达到最高活菌数,随后菌体活菌数不断减少。这是因为微生物接种到一个新的环境后一般都需要经历一段适应期,影响适应期的因素有很多,其中最重要的影响因素之一是接种量,接种量的多少明显影响延滞期的长短,一般来说,接种量大,则延滞期短,反之则长^[15]。当接种量较少时,菌体适应新环境的时间就会延长,从而导致菌体达到最高活菌数的时间也会延长;当接种量过多时,虽然菌体适应新环境的时间大大缩短,但是过多的菌悬液会使得发酵基质变得黏稠,导致下层菌体呼吸困难,抑制了菌体的大量生长繁殖,因此,最佳接种量选择为 1.5 mL。

2.2.4 培养温度

称取杜仲叶渣 20 g,放入 250 mL 锥形瓶中。固定料液比为 1:2.5,杜仲叶渣与倍花废渣的质量比为 1:0.4,接种量为 1.5 mL,料层厚度 4 cm,将培养温度分别设为 20、25、30、35、40 °C,考察其对巨大芽孢杆菌发酵的影响,试验结果见图 1D。微生物的生长均有一个最适温度,温度高于或低于这个最适温度均会对微生物的正常生长繁殖有所影响。从图 1D 可知:当发酵温度分别为 25、30 和 35 °C 时,菌体在 60 h 即可达到最大活菌数,其中,当发酵温度为 30 °C 时,菌体在 60 h 的活菌数为所有组别中最高;当温度分别为 20 °C 和 40 °C 时,菌体在 80 h 才达到最高活菌数。这是因为巨大芽孢杆菌的最适生长温度为 25 ~ 35 °C,低于或高于这个最适温度均会对菌体正常生长繁殖产生影响。因此,最佳发酵温度选择为 30 °C。

2.2.5 料层厚度

称取杜仲叶渣 20 g,放入 250 mL 锥形瓶中。固定料液比为 1:2.5,杜仲叶渣与倍花废渣的质量比为 1:0.4,接种量为 1.5 mL,培养温度 30 °C,将料层厚度分别调整为 2、4、6、8、10 cm,考察料层厚度对巨大芽孢杆菌发酵的影响,试验结果见图 1E。从图 1E 可知,当料层厚度为 2 ~ 6 cm 时,随着料层厚度的增加,菌体的活菌数不断增加,当料层厚度

超过 6 cm 时,随着料层厚度的增加,菌体的活菌数不断减少,这是因为料层厚度直接影响发酵过程中的通气和传热,料层太厚会使发酵过程中产生的热气不容易散发出来,导致温度不断升高,影响菌体的正常生长,而料层太薄会使水分散失太快,也不利于菌体的正常生长,因此,最佳的料层厚度为 6 cm。

2.3 杜仲叶渣制备的解磷生物肥料中的相关成分

对杜仲叶渣制备的解磷生物肥料中的相关成分测定结果表明,其中的腐殖酸、全氮、全磷、全钾均比杜仲叶渣中的高,这是因为巨大芽孢杆菌通过自身的生命活动将杜仲叶渣中难以分解和不能被植物直接吸收利用的物质转化成易被植物吸收利用的腐殖酸、速效氮、速效磷、速效钾等,使得解磷生物肥料中相应的物质含量增加。制备的解磷生物肥料中的水分、总养分(全氮+全磷+全钾)、重金属(汞、铬、镉、铅、砷)等均在国标限量范围内,说明由杜仲叶渣制备的解磷生物肥料是一种绿色环保的肥料,且营养丰富,可以应用于实际生产中。

3 结 论

1) 杜仲叶渣中含有丰富的蛋白质、可溶性糖、腐殖酸、氮、磷、钾等物质,可以为微生物的生长提供所需的碳源、氮源和无机盐等营养物质,具有作为载体制备生物肥料的潜力。

2) 杜仲叶渣制备解磷生物肥料的最佳工艺条件为:料液比 1:2.5,接种量 1.5 mL,发酵温度 30 °C,杜仲叶渣与倍花废弃物的质量比为 1:0.4,料层厚度 6 cm。此培养条件下巨大芽孢杆菌的最大活菌数可达 1.64×10^9 cfu/g。

3) 由杜仲叶渣最佳工艺制备的解磷生物肥料营养丰富,且其中的水分、总养分、重金属等指标均在国标限量内,说明制备的解磷生物肥料是一种绿色环保肥料,可以用于实际生产中。

参考文献(References):

- [1] 赵小蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001(3):7-11.
Zhao X R, Lin Q M. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. Soil and Fertilizer, 2001(3): 7-11.
- [2] 宋建利,石伟勇.磷细菌肥料的研究和应用现状概述[J].化肥工业,2005,32(4):18-20.
Song J L, Shi W Y. Study of phosphorus bacterial fertilizers and present status of their use[J]. Journal of Chemical Fertilizer Industry, 2005, 32(4): 18-20.
- [3] 贾瑞丰,尹光天,杨锦昌,等.不同缺素处理对红厚壳幼苗生长的影响[J].南京林业大学学报:自然科学版,2011,36(6):33

- 36.
- Jia R F, Yin G T, Yang J C, et al. Effects of different nutrient deficiency on *Calophyllum inophyllum* L. seedlings [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2011, 36(6): 33-36.
- [4] 虞伟斌. 解磷菌 K_3 的溶磷特性及其在不同土壤中定殖研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- Yu W B. Characterization of phosphate-solubilizing bacterium K_3 and colonization under different soil [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [5] 李剑锋, 师尚礼, 张淑卿, 等. 解磷微生物肥料研究进展 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2010, 23(1): 63-66.
- Li J F, Shi S L, Zhang S Q, et al. Research progress of phosphate solubilizing microbial fertilizer [J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2010, 23(1): 63-66.
- [6] 张宝贵, 李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用 [J]. 土壤学报, 1998, 35(1): 104-111.
- Zhang B G, Li G T. Roles of soil organisms on the enhancement of plant availability of soil phosphorus [J]. Acta Pedologica Sinica, 1998, 35(1): 104-111.
- [7] 刘辉, 吴小芹, 任嘉红, 等. 一株荧光假单胞菌的溶磷特性及其对杨树的促生效果 [J]. 林业科学, 2013, 49(9): 112-118.
- Liu H, Wu X Q, Ren J H, et al. Phosphate-dissolving characteristics and growth promotion effect of *Pseudomonads fluorescent* JW-JSI on poplar seedlings [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(9): 112-118.
- [8] Whitelaw M A, Harden T J, Bender G L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. [J]. Australian Journal of Soil Research, 1997, 35(2): 291-300.
- [9] 梅丽娜, 姚拓, 刘雯雯, 等. 接种外源微生物对蘑菇渣堆肥的影响 [J]. 草原与草坪, 2010, 30(4): 81-84.
- Mei L N, Yao T, Liu W W, et al. Effects of inoculating microorganism on spent mushroom compost [J]. Grassland and Turf, 2010, 30(4): 81-84.
- [10] Ferreira E M, Castro I V. Residues of the cork industry as carriers for the production of legume inoculants [J]. Silva Lusitana, 2005, 13(2): 159-167.
- [11] 莫海涛, 张小勇, 张建安, 等. 以木质素为载体固态发酵制备生物肥料的工艺条件 [J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(5): 53-56.
- Mo H T, Zhang X Y, Zhang J A, et al. Study on technological conditions of SSF to prepare the bio-fertilizer with lignin as carrier [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 29(5): 53-56.
- [12] 尹涛. 苹果渣生产有机肥料和微生物肥料的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2004.
- Yin T. Research on the organic fertilizer and microbial fertilizer prepared by apple pomace [D]. Xi'an: Northwest University, 2004.
- [13] 王娅亚, 薛飞燕, 王有年, 等. 餐厨垃圾转化为生物肥料的探索研究 [J]. 农学学报, 2013, 3(1): 36-40.
- Wang Y Y, Xue F Y, Wang Y N, et al. Study on bio-fertilizer production from restaurant wastes [J]. Journal of Agriculture, 2013, 3(1): 36-40.
- [14] 张昌伟, 彭胜, 张琳杰, 等. 不同比例杜仲叶渣对平菇栽培效果的影响 [J]. 食品发酵与工业, 2013, 39(6): 95-99.
- Zhang C W, Peng S, Zhang L J, et al. Effects of different proportion of leaves residual of *Eucommia ulmoides* Olive on the cultivation of *Pleurotus* [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 39(6): 95-99.
- [15] 卢成英, 钟以举, 杜仲叶渣栽培食用菌研究初报 [J]. 中国林副特产, 2000(3): 3-4.
- Lu C Y, Zhong Y J. Study on the cultivation of edible mushroom by leaves residual of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Quarterly of Forest By-Product and Speciality in China, 2000(3): 3-4.

(责任编辑 刘昌来)