植物营养与肥料学报 2014,20(5):1194-1202
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2014.0516

添加三种外源蛋白研制生物有机肥及其促生效果

张 苗,施娟娟,曹亮亮,李 荣*,张 杨,梁晓琳,沈其荣
(农业部长江中下游植物营养与肥料重点实验室,江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室,
江苏省协同创新中心,南京农业大学资源与环境科学学院,江苏南京 210095)

摘要:【目的】生物有机肥已经被广泛证明具有能够减少或代替部分化肥、农药的使用,增强作物抗逆性,改善作物品质,改良土壤等优势,同时其兼具有的促进作物生长和防控土传病害功能,已经越来越多地被人们所认可并在生产上广泛应用,其发挥作用的关键在于所含功能微生物的数量。为提升生物有机肥料中功能微生物的数量,有机载体中添加外源氨基酸固态发酵功能菌是研制生物有机肥的主要手段。目前菜粕为主要的外源添加氨基酸,但其高成本严重阻碍了生物有机肥产业的发展,开发利用多种废弃蛋白作为外源添加氨基酸,能够降低生物有机肥的成本,推动其产业的发展。**【方法】**本研究利用单因素和正交试验结合法,以废弃羽毛膨化粉、太湖打捞藻泥两种废弃蛋白资源和菜粕为外源添加氨基酸,添加固态发酵根际功能菌(PGPR)*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 研制生物有机肥,并利用盆栽试验分析了其苗期促生效果。**【结果】**单因素试验结果表明,最佳的固态发酵接菌量与含水量分别为 7.5% 和 40%;正交试验结果表明,最优配方中,藻泥、菜粕和羽毛粉的最适添加量分别为 5%、8% 和 12%;在最优配方下,经过 7 天的固态发酵,新型生物有机肥料中功能菌株 SQR9 的活菌数达到 3.88×10^8 cfu/g(肥料干重),游离氨基酸和短肽总含量达到 1.39%,均显著高于未添加外源氨基酸所生产的生物有机肥;同时外源氨基酸的添加能够显著增加新型生物有机肥中总氮的含量。等养分盆栽试验结果表明,新型生物有机肥能够显著促进黄瓜和番茄植株苗期的生长,移栽 40 天时,黄瓜和茄子植株的株高、茎粗和 SPAD 值均显著高于对照,与未添加外源氨基酸的生物有机肥处理相比,黄瓜的地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重分别提高了 51.15%、19.59%、4.59% 和 22.66%,茄子分别提高了 134.29%、29.73%、72.35% 和 43.69%;与普通牛粪有机肥处理相比,黄瓜分别提高了 65.56%、33.39%、17.89% 和 39.18%,茄子分别提高了 154.01%、38.03%、78.95% 和 78.13%。**【结论】**两种废弃蛋白资源结合菜粕的添加,能够有效促进功能菌株的固态发酵和提升生物有机肥的作用效果,研究结果能够为该类废弃资源的循环利用提供理论依据,为 PGPR 产品的开发及新型生物有机肥的研发提供技术支撑。

关键词:生物有机肥;*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9;菜粕;太湖打捞藻泥;羽毛粉
中图分类号:S141 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-505X(2014)05-1194-09

Adding three protein resources as solid-state fermentation medium for producing bio-organic fertilizer

ZHANG Miao, SHI Juan-juan, CAO Liang-liang, LI Rong*, ZHANG Yang, LIANG Xiao-lin, SHEN Qi-rong
(*Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilization in Low-Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture /Jiangsu Key Laboratory of Solid Organic Waste Utilization/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization/ College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China*)

Abstract:【Objectives】It has been extensively demonstrated that bio-organic fertilizer (BIO) could eventually replace some of the chemical fertilizers and pesticides that are currently overused in agriculture, enhance stress tolerance of plants, improve crop quality and soil quality, and so on. Meanwhile, the application of these BIOs is becoming more popular since more and more farmers are recognizing the effect of BIOs not only in promoting plant

收稿日期:2013-09-10 **接受日期:**2014-01-26
基金项目:国家自然科学基金项目(41101231);江苏省科技支撑计划(农业)(BE2012377);中国博士后科学基金(2011M501248,2012T50479);国家"863"计划项目(2013AA100802)资助。
作者简介:张苗(1988—),女,江苏扬州人,硕士研究生,主要从事生物有机肥方面的研究。E-mail:1281926353@qq.com
* 通信作者 Tel:025-84396104,E-mail:lirong@njau.edu.cn

growth but also in protecting plant roots from soil-born pathogens as well. In addition, number of functional microbes play a key role for producing the best effects. Thus, in order to improve quality of the produced BIO, addition of amino acids as solid-state fermentation (SSF) medium is a main method for producing BIOs with functional microbes. However, the production costs are significantly increased due to high cost of oil rapeseed cakes which are the common exogenous amino acids till now, thereby limiting the large-scale extension of BIOs. Therefore, new SSF media should be developed to greatly reduce the production cost while supplying essential nutrition for the special microbial species and to further promote efficacious plant growth. **【Methods】** This study investigated possibility of producing the BIO with PRPG strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by adding rapeseed cake and two high-protein solid wastes, algal sludge and feather powder, in cow dung compost using the single-factor test and orthogonal experiment. **【Results】** The single-factor test results show that the optimum inoculum volume and moisture content are 7.5% and 40%, respectively. The orthogonal test reveals that the cell density of strain SQR9 could reach up to 3.88×10^8 cfu/g (DW) in the optimum combination consisting of 5% algal sludge, 8% rapeseed and 12% feather powder after 7 days of SSF, the contents of total free amino acids and short peptides TAPS in the resulting BIO could reach up to 1.39% (DW), and the values are both higher than those in the control product produced with none exogenous amino acids, meanwhile, the content of total nitrogen is also higher. The pot experiment results indicate that the BIO application efficiently promotes the plant growth. Forty days after being applied to the cucumber and eggplant plants, the novel BIO treatment results in greater plant heights, stem diameters and SPAD values compared to the two controls. Compared with the BOF (Bio-organic fertilizer) treatment, the BIO treatment increases the above- and below-ground fresh weights of cucumbers by 51.15% and 19.59%, the above- and below-ground dry weights of cucumbers by 4.59% and 22.66%, the above- and below-ground fresh weights of eggplants by 134.29% and 29.73% and the above- and below-ground dry weights of eggplants by 72.35% and 43.69%. Compared with the OF (organic fertilizer) treatment, the BIO treatment increases the above- and below-ground fresh and dry weights of cucumbers by 65.56%, 33.39%, 17.89% and 39.18% and the above- and below-ground fresh and dry weights of eggplants by 154.01%, 38.03%, 78.95% and 78.13%, respectively. **【Cconclusion】** The addition of high-protein solid wastes and rapeseed cake could effectively promote the SFF with the functional microbe and improve the fertilizer quality. This research also provides a novel way of cyclic utilization of algal sludge and feather powder, and technology supports for exploring PGPR products and novel low-cost but high-quality BIOs.

Key words: Bio-organic fertilizer; *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9; rapeseed cake; algal sludge refloated from Taihu Lake; feather powder

生物有机肥是指特定功能微生物与主要以动植物残体(如畜禽粪便、农作物秸秆等)为来源并经无害化处理、腐熟的有机物料复合而成的一类兼具微生物肥料和有机肥效应的肥料[1]。此类肥料含有大量具特定功能的微生物，其生命活动是生物有机肥优于普通有机肥的关键因素。生物有机肥具有减少或代替部分化肥、农药的使用[2-3]，增强作物抗逆性[4-5]，改善作物品质[6-7]，改良土壤[8-9]等优势，已经越来越多地被人们所认可并在生产上广泛应用。目前，多以秸秆、鸡粪、酒糟、牛粪、猪粪或葛根菌糠等单一的固体废弃物为有机载体来发酵功能微生物研制生物有机肥[10]，也有一些高端生物有机肥会在畜禽粪便等固体废弃物的基础上添加一定的氨基酸材料促进功能微生物发酵、提高肥料品质，常用的氨基酸添加材料为菜粕[11-12]，大量的研究中菜粕的添加量已经达到50%，虽肥料效果很好，但由于菜粕成本较高，导致该类生物有机肥虽具优异的效果，但大面积推广受到限制。因此，考虑开发更多的廉价蛋白源固体废弃物作为生物有机肥生产中的外源添加氨基酸来代替部分菜饼，在确保生物有机肥品质的前提下大幅度降低肥料成本，将为生物有机肥产业快速发展提供保障。

目前廉价的蛋白资源很多，有动物血、啤酒酵母废水、废弃羽毛和因水体富营养化爆发而产生的蓝藻等，其中，废弃羽毛和太湖打捞藻泥是目前常见的废弃蛋白资源。随着世界养殖业的发展，全世界每年产生大量的鸡毛，Agrahari 和 Wadhwa(2010)预测全世界每年约有240亿只鸡被杀，每年产生大约85

亿吨家禽羽毛[13]，且大部分羽毛没有被合理地加工利用，作为丰富的蛋白资源被白白浪费，同时也造成了严重的环境污染，羽毛富含85%以上的蛋白，如果能够将膨化羽毛粉作为生产生物有机肥的原料充分利用，将有利于大量消耗这一废弃蛋白资源；蓝藻中含有大量的有机质和植物生长必需的营养物质，富含藻蛋白，据测定，蓝藻的粗蛋白约为43.17%，藻蓝蛋白为8%～15%，藻多糖为5%～8%[14]；微囊藻中氮、蛋白质含量更是高达11.18%、69.78%，目前其用途主要有能源化利用，提取天然色素、藻胆蛋白、多糖等[15]，但是都因其处理规模小、工艺复杂，很难大批量地解决蓝藻爆发时所打捞的藻泥。因此，从原料高效资源化利用出发，本研究选择这两种废弃物料作为外源添加氨基酸代替部分菜饼，研究新型的生物有机肥的配方和工艺。

畜禽粪便经过一次高温发酵后形成的腐熟堆肥，加入外源氨基酸接种植物根际促生菌后，经过短期发酵可研制成兼具有机肥和微生物肥效果的高效肥。本研究选择腐熟的牛粪有机肥为基本有机载体，藻泥、菜粕、羽毛粉三种蛋白质资源为外源添加剂，添加固态发酵 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9，研制含PGPR的生物有机肥；同时通过盆栽试验研究该生物有机肥对植株苗期的促生效果，以期为资源化利用以上废弃物和新型生物有机肥的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

腐熟牛粪有机肥由江阴市联业生物科技有限公司提供，含水量25.23%、有机质28.88%、总氮1.43%、P_2O_5 2.28%、K_2O 1.45%；菜粕、废弃羽毛膨化粉（羽毛粉）为江苏新天地生物肥料工程中心有限公司提供，菜粕含总氮6.15%、P_2O_5 2.51%和K_2O 0.66%，羽毛粉含总氮13.26%、P_2O_5 0.17%和K_2O 0.21%；藻泥由宜兴太湖蓝藻打捞站提供，含水量85%～88%、总氮4.48%、P_2O_5 1.71%、K_2O 0.63%。

具拮抗和促生功能的根际功能菌 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9（SQR9）由江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室筛选保存[16]。功能菌SQR9种子悬液的制备：采用液体LB培养基，在30℃、170 rpm摇床条件下培养12 h的SQR9种子发酵液，按照5%的量接入到液体LB培养基中，相同条件下摇床培养36 h。

盆栽黄瓜品种为津春四号、茄子品种为江蔬苏琦茄。盆栽土壤基本性状为pH 6.39、有机碳含量为28.69 g/kg、速效氮79.41 mg/kg、速效磷25.77 mg/kg、速效钾59.44 mg/kg。

1.2 菌株SQR9的计数方法

菌株SQR9采用选择性培养基：蛋白胨10 g、酵母粉5 g、NaCl 10 g、琼脂2.5%、去离子水1000 mL，1%多粘菌素2 mL/L、1%放线菌酮4 mL/L[17]。功能菌SQR9数量采用梯度稀释平板计数法，将肥料样稀释成10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}等不同梯度稀释液。用无菌吸管各取0.1 mL涂布于相应培养基平板中，不同梯度各三个平板，涂布均匀，于30℃培养箱中培养36 h后计数。功能菌数量以每克肥料干重计算，以cfu/g干重表示。

1.3 条件单因素试验的设计

固体发酵含水量的确定：牛粪有机肥添加量85%（干重，下同），菜粕、羽毛粉和藻泥添加量与功能菌SQR9接种量均为5%，含水量设为30%、35%、40%、45%、50%和55%，每天拌匀取样测定堆体含水量并进行调节。发酵温度室温（30±2℃），固态发酵于周转箱（31 cm×24 cm×12.5 cm）中进行，肥料堆成8～10 cm高的锥形（500 g，干重），发酵7天，每隔12 h翻一次堆。

功能菌SQR9接种量的确定：牛粪有机肥添加量85%，菜粕、羽毛粉和藻泥添加量均为5%，固体发酵含水量40%，接种量设为2.5%、5%、7.5%、10%和15%（V/W，体积质量比），发酵温度室温（30±2℃）；固态发酵条件同上。

1.4 三因素水平的确定

菜粕参试水平确定：藻泥5%，羽毛粉5%，菜粕含量设为1%、5%、10%、15%、20%和25%六个水平。藻泥参试水平确定：菜粕5%，羽毛粉5%，藻泥含量设为1%、3%、5%、7%、9%和11%六个水平。羽毛粉参试水平确定：菜粕5%，藻泥5%，羽毛粉含量设为1%、5%、10%、15%、20%和25%六个水平。其他发酵条件同上。

1.5 正交试验

对藻泥、菜粕、羽毛粉三因素选取的三水平，采用三因素三水平的固态发酵正交试验选择最佳配方组合，采用$L_9(3^4)$正交表安排试验。

1.6 游离氨基酸和短肽含量测定

总游离氨基酸和短肽含量测定方法参考Airhart等[18]，方法稍加修改。肥料和0.1 M的HCl以1∶10的比例混合，室温150 rpm震荡1 h后，6000 rpm

离心 10 min 取上清，茚三酮测定法测定总游离氨基酸和短肽含量。

1.7　盆栽试验

按照正交试验所获最优配方，对功能菌株进行放大发酵（10 kg 干重），获得新型生物有机肥（BIO），同时利用未添加外源氨基酸牛粪有机肥对功能菌进行固态发酵，获得对照生物有机肥（BOF）。接种量、含水量和其他发酵条件均同上。盆栽试验于 2012 年 5 月 15 日～6 月 30 日在江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术研究重点实验室温室（江苏宜兴）进行。盆栽试验设：1）OF 添加 1% 腐熟牛粪有机肥（干重，下同）；2）BOF 添加 1% BOF；3）BIO 添加 1% BIO，考虑到牛粪有机肥养分及肥效较一般猪粪、鸡粪等畜禽粪便养分含量低[19]，故肥料加入量为 1%，处理间氮、磷、钾养分以化肥补齐。每盆装土 3 kg，每个处理重复 10 次，分别于移栽 20 d、30 d 和 40 d 时测定植株的株高、茎围、SPAD 值；40 d 植株收获时将地上地下部剪开，测定上下部鲜重；地上地下部干重测定为在 105℃杀青 15 分钟，70℃烘干至恒重，称重[20]。

1.8　数据分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析，使用最小显著差异法（Least significant difference，LSD）检验进行多重比较（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1　含水量和接种量对菌株 SQR9 固态发酵的影响

不同的含水量对菌株的固态发酵效果如图 1A 所示，40% 的含水量最适于菌株 SQR9 的固态发酵，发酵效果显著高于其他处理；含水量高于 45% 后，随着含水量的升高菌株 SQR9 的菌落数显著下降，高于 50% 后，处理间无显著性差异；含水量为 30% 和 35% 时，菌株的发酵效果无显著性差异。因此，后续试验含水量均设为 40%。

不同的初始接菌量对菌株的固态发酵效果如图 1B 所示，随着接菌量的提高，功能菌 SQR9 的菌落数逐渐提高，但当接菌量大于 7.5% 时，接菌量对最终肥料中的功能菌活菌数无显著性影响，从生产成本考虑，后续试验的初始接菌量为 7.5%。

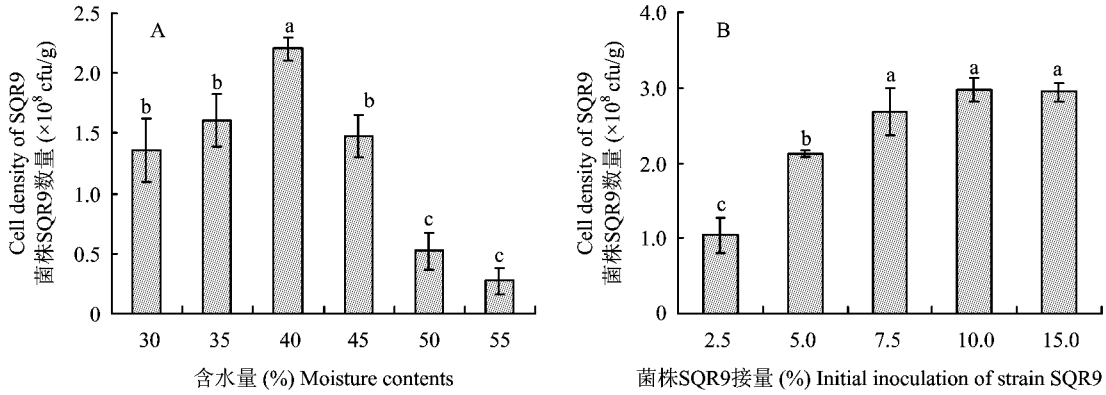

图 1　发酵含水量（A）、接种量（B）对 SQR9 菌落数的影响

Fig.1　The cell density of strain SQR9 under different moisture contents (A) and the initial inoculation (B)

［注（Note）：柱上不同小写字母表示 0.05 水平差异显著

The different letters above the bars indicate statistically significant differences at the 0.05 probability level.］

2.2　三因素水平选择

在含 5% 菜粕和 5% 羽毛粉的混合堆体中添加不同含量藻泥对功能菌的发酵效果如图 2A 所示，在添加量低于 7% 时，随着藻泥加入量的增加，功能菌数量逐渐增多；高于 7% 时，随着藻泥加入量的增加，功能菌数量逐渐减少；藻泥添加量为 7% 时，功能菌数量达到 1.93×10^8 cfu/g，其与 5% 添加量的发酵效果无显著差异。从功能菌的固态发酵数量和资源化废弃藻泥的需要两方面考虑，本研究最终选择 5%、7%、9% 为正交参试水平。

在 5% 藻泥、5% 羽毛粉的基础上加入不同含量菜粕的发酵效果如图 2B 所示，随着菜粕含量的增加，SQR9 的菌数随之增加。当菜粕含量达到 10% 时，功能菌增加幅度降低，菜粕含量 10% 条件下发酵菌数达到 2.35×10^8 cfu/g，DW，25% 条件下发酵菌数达到 2.78×10^8 cfu/g，DW，无倍数增加。考虑到菜粕的成本问题，选择正交因素水平为 8%、10%、12%。

在5%菜粕、5%藻泥的基础上加入不同含量的羽毛粉，结果如图2C所示，随着羽毛粉含量的增加，菌株SQR9菌落数随之增加，在含量达到15%时菌落数达到最多，之后，随着羽毛粉的增加菌数降低。最终以15%为界点，选择正交因素水平为12%、15%、18%。

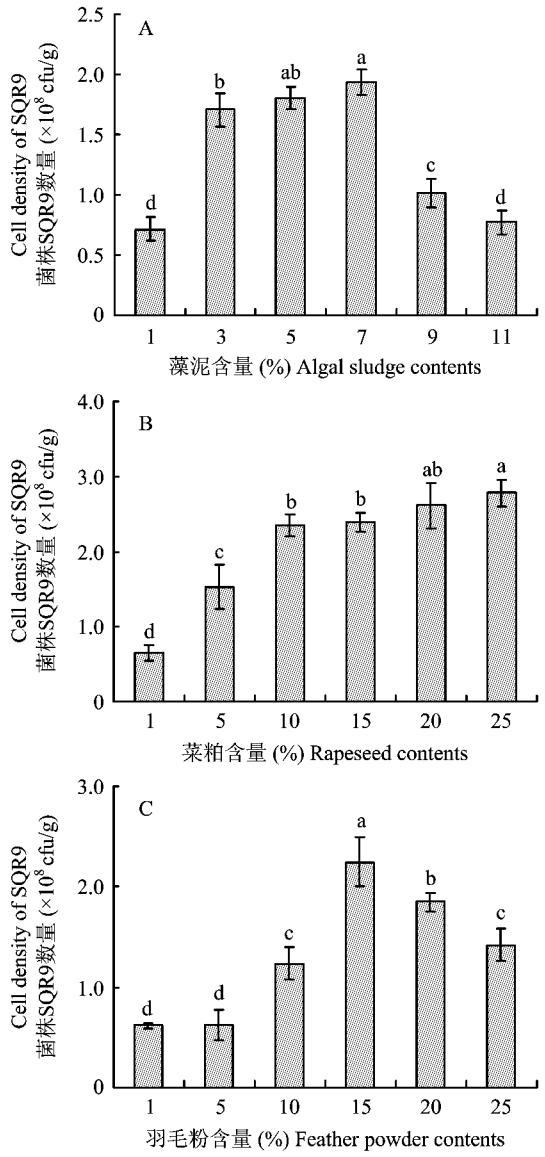

图2 不同含量藻泥(A)、菜粕(B)、羽毛粉(C)对SQR9发酵菌落数的影响

Fig. 2 The cell density of strain SQR9 under different algal sludge(A), rapeseed cake (B) and feather powder(C) amounts

2.3 正交试验结果

为进一步优化发酵配方，对发酵的三种外源添加原料进行三因素三水平正交试验(表1)。结果如表2所示，由表2的直观分析结果显示，A因素的极差最大，B因素、C因素次之，因此，影响菌株SQR9菌落数各因素顺序为A > B > C，藻泥的影响最大，其次为菜粕，而羽毛粉影响最小。试验结果的方差分析结果表明，不同水平的藻泥和菜粕对功能菌发酵菌落数有显著性影响($P < 0.05$)，而羽毛粉影响则较小，未达到显著性(表3)。统计分析结果可得最优水平组为$A_1B_1C_1$，即藻泥5%、菜粕8%、羽毛粉12%。

表1 $L_9(3^4)$正交试验表头设计表

Table 1 The design form of the orthogonal test $L_9(3^4)$

水平 Factor level	因素 Factor		
	藻泥 Algal sludge	菜粕 Rapeseed cake	羽毛粉 Feather power
1	5%	8%	12%
2	7%	10%	15%
3	9%	12%	18%

2.4 不同施肥处理对黄瓜、茄子生长的影响

盆栽试验中新型生物有机肥配方(BIO)、普通生物有机肥(BOF)以及有机肥(OF)对黄瓜、茄子株高、茎围、SPAD值的影响如图3、图4所示。图3结果显示，移栽20天时，BIO处理的黄瓜株高和茎粗显著高于OF对照，与BOF相比无显著性差异，BOF处理的植株株高和茎粗均高于OF对照，二者之间无显著性差异，各处理间的SPAD值也无显著性差异；移栽30天时，BIO处理的株高和茎粗均显著高于其他两个处理，BOF处理的株高显著高于OF对照，茎粗高于OF对照但无显著性差异，各处理间的SPAD值同样无显著性差异；移栽40天时，BIO处理的株高与BOF处理和OF对照株高的差距增大且存在显著性差异，其株高分别比BOF、OF高出15.51%、23.57%，BOF处理的植株株高和茎粗均高于OF对照，SPAD值在40天时，BIO处理显著高于BOF处理和OF对照。图4结果显示，茄子移栽20天、30天、40天，BIO处理的株高、茎粗均显著高于BOF和OF对照；40天时，BIO株高、茎粗相对BOF分别增加35.89%、10.36%，与OF相比，BOF处理的株高和茎粗虽无显著性差异，但均高于OF对照，仍具有一定促生效果，移栽40 d时，BIO处理的SPAD值显著高于BOF处理和OF对照。

表 2　发酵配方正交试验设计及结果

Table 2　The result of strain SQR9 in the orthogonal test $L_9(3^4)$

试验编号 Number	因素 Factor			菌株 SQR9 菌落数 Cell density of strain SQR9 ($\times 10^8$ cfu/g, DW)
	藻泥 Algal sludge	菜粕 Rapeseed cake	羽毛粉 Feather power	
1	1	1	1	3.876
2	1	2	2	2.196
3	1	3	3	3.063
4	2	1	2	2.614
5	2	2	3	2.475
6	2	3	1	2.666
7	3	1	3	2.707
8	3	2	1	1.708
9	3	3	2	1.542
K_1	3.044	3.066	2.750	
K_2	2.585	2.126	2.117	
K_3	1.986	2.424	2.749	
R(极差)	1.058	0.940	0.633	

表 3　菌株 SQR9 菌落数方差分析

Table 3　The variance analysis of cell density of strain SQR9

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	P
藻泥 Algal sludge	1.692	2	0.846	38.287	<0.05
菜粕 Rapeseed cake	1.384	2	0.692	31.314	<0.05
羽毛粉 Feather power	0.798	2	0.399	18.058	

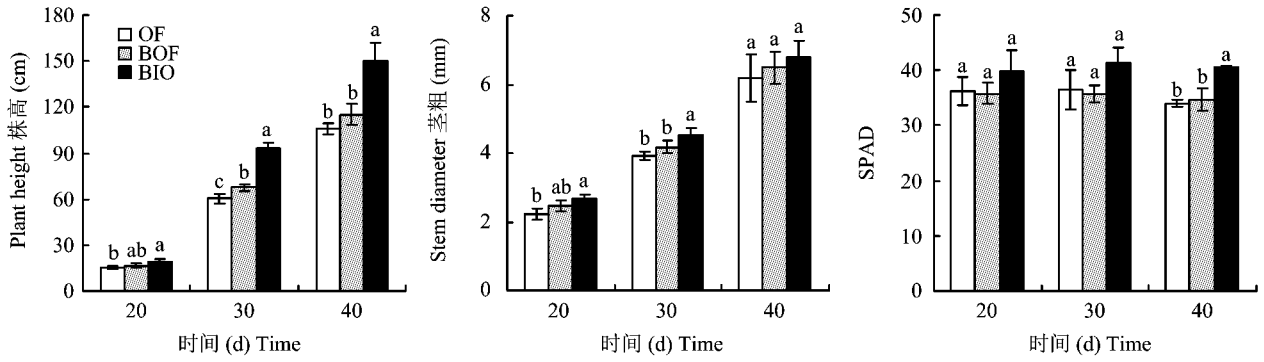

图 3　不同施肥处理对黄瓜株高、茎粗、SPAD 的影响

Fig. 3　Effects of different fertilizer treatments on cucumber height, stem diameter and SPAD

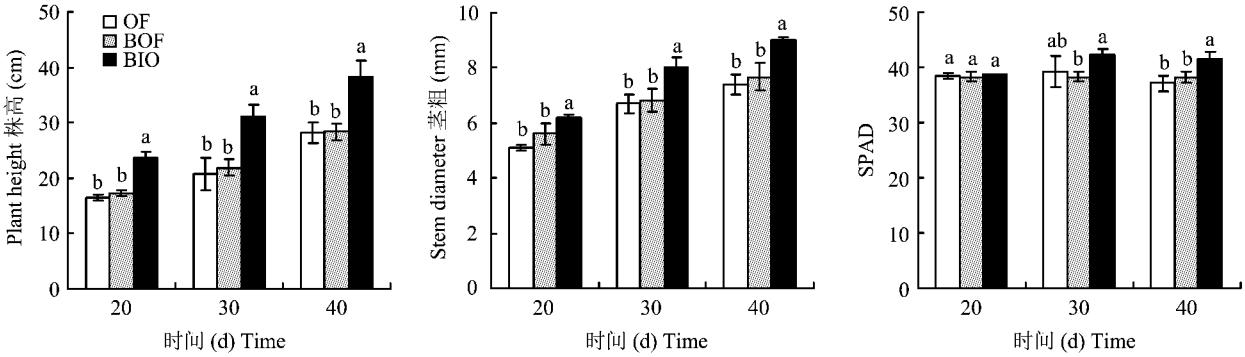

图4 不同施肥处理对茄子株高、茎粗、SPAD值的影响

Fig.4 Effects of different fertilizer treatments on eggplant height, stem diameter and SPAD

移栽40 d,不同施肥处理对两种植株生物量的影响如表4所示。BIO处理与BOF处理和OF对照相比,黄瓜和茄子地上部鲜重、干重,地下部鲜重均存在显著性差异。BIO处理的黄瓜地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重比BOF处理分别增加了51.15%、19.59%、5.49%和17.75%,比OF处理分别增加了65.56%、33.49%、18.90%和37.96%。BIO处理的茄子地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重比BOF处理分别增加134.29%、29.73%、70.28%和40.34%,比OF处理分别增加154.07%、38.03%、76.79%和73.96%。可见新型生物有机肥促生效果显著高于普通的生物有机肥和有机肥。

盆栽试验中BOF、BIO处理肥料基本理化性质如表5。与BOF处理相比,外源氨基酸的添加一方面促进了功能菌的固态发酵,BIO处理中的菌落数为BOF处理中的12.13倍;同时肥料中N和P养分的含量分别增加了1.5个百分点和0.41个百分点,且游离氨基酸和短肽总含量(TAPS)远远高于BOF处理。

表4 不同施肥处理对黄瓜、茄子生物量的影响

Table 4 Effects of different fertilizer treatments on cucumber and eggplant biomass

处理 Treatment		鲜重 Fresh weight (g/plant)		干重 Dry weight (g/plant)	
		地上部 Shoot	地下部 Root	地上部 Shoot	地下部 Root
黄瓜 Cucumber	OF	34.00 ±3.43 b	8.69 ±0.41 b	5.98 ±0.15 b	2.45 ±0.51 a
	BOF	37.24 ±2.69 b	9.70 ±0.20 b	6.74 ±0.24 b	2.78 ±0.14 a
	BIO	56.29 ±12.91 a	11.6 ±0.38 a	7.11 ±0.29 a	3.38 ±0.81 a
茄子 Eggplant	OF	29.85 ±3.34 b	9.23 ±1.30 b	4.18 ±1.01 b	0.96 ±0.12 b
	BOF	32.37 ±4.58 b	9.82 ±1.32 b	4.34 ±0.60 b	1.19 ±0.13 b
	BIO	75.84 ±3.53 a	12.74 ±0.63 a	7.39 ±0.34 a	1.67 ±0.37 a

注(Note):不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$) Different small letters mean significant different among treatments ($P<0.05$).

表5 生物有机肥基本理化性质

Table 5 Physical and chemical characteristics of BOF and BIO

处理 Treatment	SQR9数量(cfu/g, DW) Number of strain SQR9	全氮(%) Total nitrogen	P_2O_5 (%)	K_2O (%)	pH	[a]TAPS (%)	Ec
BOF	0.32×10^8	1.32	2.23	1.35	7.32	0.05	3.95
BIO	3.88×10^8	2.82	2.64	1.29	7.55	1.39	5.27

注(Note):a表示游离氨基酸和短肽总含量 Total contents of free amino acids and short peptides.

3 讨论与结论

单因素发酵条件试验表明，在一定范围内，随着接菌量的增加功能菌数量逐渐增多，然而超过7.5%后，则无显著性增加，结合生产成本，最适接种量确定为7.5%。含水量对固态发酵效果影响较大，物料含水量过高会影响固体颗粒之间的松散性、物料溶氧量，含水量过低会影响微生物对营养基质的利用[21-22]。通常固体发酵的固液质量比在1∶1～10∶1之间[23]，不同原料、不同菌种等对固态发酵含水量具有不同的要求，柳芳等研究则表明，在中药渣与15%麸皮混堆中，65%的初始含水量最适合功能微生物发酵[24]。穆燕魁等研究表明，在料水比为10∶6的条件下，比较适合根际有益链霉菌的固体发酵[25]。兰时乐等[26]研究表明，芽孢杆菌在菜籽饼脱毒固体发酵中最适料水比为1∶0.585。在本试验中，40%的含水量最适宜功能菌的增值。

正交试验结果表明，藻泥是影响功能菌发酵的主要因素，菜粕其次，羽毛粉对功能菌的发酵没有显著影响。藻泥成为发酵的主要因素，推测是由于藻泥富含大量易于微生物利用的营养物质，所用藻泥在打捞站已堆放一个多月，部分物质可能已经初步分解，从而有助于功能菌增殖。菜粕同样是影响功能菌增殖的主要因素，菜粕堆肥作为一种优质的外源添加氨基酸，由于其富含氨基酸及活性多肽，具有碳源活性高、氮素有效性高的特性[27]，已经被广泛证明能够推动功能菌的固态发酵[11]。膨化羽毛粉对于功能菌株的发酵影响最小，可能是因为羽毛粉中大量的角蛋白由于二硫键的交联作用成为了复杂的三维网状结构，难以被微生物降解所导致[28]。

盆栽试验结果表明，在氮磷钾养分补齐的前提条件下，与腐熟牛粪有机肥相比，普通生物有机肥在各项促生指标上虽没有达到显著性差异，但促生效果仍然优于普通有机肥，推断是由于生物有机肥中含有更大量的功能菌 *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9，该菌株首次被鉴定为 *Bacillus subtilis*，目前根据全基因组的分析，已被重新归类为 *Bacillus amyloliquefaciens*，菌株的促进植物生长的效果已经被证明[29]；含外源氨基酸研制的生物有机肥的促生效果显著优于普通生物有机肥和有机肥，这可能是由于该肥料中不仅含有大量的功能微生物，同时外源蛋白的添加增加了肥料中的养分、游离氨基酸和短肽的含量，氨基酸已经被广泛证明能够有效促进植物的生长[30,31]。

本研究结果表明，根际促生菌 SQR 发酵基本条件为含水量40%、接菌量7.5%，正交配方组合为藻泥5%、菜粕8%、羽毛粉12%、牛粪75%。本研究初步开发了藻泥和羽毛粉两种废弃蛋白资源和菜粕为固态发酵添加剂，发酵功能菌研制生物有机肥的新配方，此新型的生物有机肥的生产，能够在保证肥料效果的前提下，大幅度降低生物有机肥料的成本，研究结果同时能够为该类废弃资源的循环利用提供理论依据。

参 考 文 献：

[1] 沈德龙，曹凤明，李力. 我国生物有机肥的发展现状及展望[J]. 中国土壤与肥料，2007，(6)：1-5.
Shen D L, Cao F M, Li L. Development status and prospect of microbial organic fertilizer in China [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2007, (6): 1-5.

[2] El Kramany M F, Bahr A A, Manal *et al*. Utilization of bio-fertilizers in field crops production 16-groundnut yield, its components and seeds content as affected by partial replacement of chemical fertilizers by Bio-organic fertilizers[J]. Journal of Applied Sciences Research, 2007, (3): 25-29.

[3] 袁英英，李敏清，胡伟，等. 生物有机肥对番茄青枯病的防效及对土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报，2011，7(30)：1344-1350.
Yuan Y Y, Li M Q, Hu W *et al*. Effect of biological organic fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microorganism [J], Journal of Agro-Environment Science, 2011, 7 (30): 1344-1350.

[4] 凌宁，王秋君，杨兴明，等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报，2009，15(5)：1136-1141.
Ling N, Wang Q J, Yang X M *et al*. Control of *Fusarium* wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15 (5): 1136-1141.

[5] 马田田，杨兴明，沈其荣，陈巍. 生物有机肥对防治山药根茎腐病和促进山药生长的研究[J]. 土壤，2013，45(2)：1301-1305.
Ma T T, Yang X M, Shen Q R, Chen W. Effects of bio-organic fertilizer on controlling root and stem rot and promoting growth of yam[J]. Soils, 2013, 45(2): 1301-1305.

[6] 韦忠，尹永强，钟启德，等. 施用生物有机肥对烤烟生长及其产量和品质的影响[J]. 中国农学通报，2011，27(3)：135-138.
Wei Z, Yin Y Q, Zhong Q D *et al*. Effect of application of bio-organic fertilizer on growth, yield and quality of flue-cured tobacco [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(3): 135-138.

[7] 张建国，聂俊华，杜振宇. 复合生物有机肥在烤烟生产中的应用研究[J]. 植物营养与肥料学报，2004，10(4)：424-428.
Zhang J G, Nie J H, Du Z Y. Response of flue-cured tobacco to compound bio-organic fertilizer[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2004, 10(4): 424-428.

[8] 邱建军，王立刚，唐华俊，等. 东北三省耕地土壤有机碳储量

变化的模拟研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1166-1171.
Qiu J J, Wang L G, Tang H J *et al*. Study on the situation of soil organic carbon storage in arable lands in northeast China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(8): 1166-1171.

[9] 王立刚, 李维炯, 邱建军, 等. 生物有机肥对作物生长、土壤肥力及产量的效应研究[J]. 中国土壤与肥料, 2004, (5): 12-16.
Wang L G, Li W J, Qiu J J *et al*. Effect of biological organic fertilizer on crops growth, soil fertility and yield [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2004, (5): 12-16.

[10] 张余莽, 周海军, 张景野, 等. 生物有机肥研究进展[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(3): 37-40.
Zhang Y M, Zhou H J, Zhang J Y *et al*. Progress of studies of bio-organic fertilizer[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2010, 35(3): 37-40.

[11] Qiu M H, Zhang R F, Xue C *et al*. Application of bio-organic fertilizer can control Fusarium wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48: 807-816.

[12] 丁传雨, 乔焕英, 沈其荣, 等. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2): 239-245.
Ding C Y, Qiao H Y, Shen Q R *et al*. Control effect and mechanism research of bio-organic fertilizer on eggplant bacterial wilt[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(2): 239-245.

[13] Agrahari S, Wadhwa N. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant[J]. International Journal of Poultry Science, 2010, 9(5): 482-489.

[14] 范良民. 滇池蓝藻成分分析及利用途径探讨[J]. 云南环境科学, 1999, 18(2): 45-47.
Fan L M. On contents of blue algae in Dianchi lake and its utilization[J]. Yunnan Environmental Science, 1999, 18(2): 45-47.

[15] 许玲, 张无敌, 尹芳, 等. 蓝藻综合利用研究现状[J]. 现代农业科技, 2010, (8): 283-284.
Xu L, Zhang W D, Yin F *et al*. Research status on integrated utilization of blue algae [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010, (8): 283-284.

[16] Cao Y, Zhang Z H, Ling N *et al*. *Bacillus subtilis* SQR9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47: 495-506.

[17] Wang B B, Yuan J, Zhang J *et al*. Effects of novel bio-organic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana[J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49: 435-446.

[18] Airhart J, Vidrich A, Khairallah EA. Compartmentation of free amino acids for protein synthesis in rat liver [J]. Biochemical Journal, 1974, 140: 539-545.

[19] 王丽英, 张彦才, 陈丽莉, 等. 不同种类畜禽粪肥与化肥配施对设施番茄产量品质和土壤养分的影响[J]. 华北农学报, 2011, 26: 152-156.
Wang L Y, Zhang Y C, Chen L L *et al*. Effects of different kinds of manure combination with chemical fertilizer on yield, quality and soil nutrient content in greenhouse tomato [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26: 152-156.

[20] 何欣, 郝文雅, 杨兴明, 等. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防治的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(4): 978-985.
He X, Hao W Y, Yang X M *et al*. Effect of bioorganic fertilization on growth and controlling fusarium-wilt disease of banana[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(4): 978-985.

[21] Jackson A M, Whipps J M, Lynch J M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of the four fungi with disease biocontrol potential [J]. World Microbiol Biotechnol, 1991, 7(2): 494-501.

[22] Kundsen G R, Li B. Effects of temperature, soil moisture, and wheat brab on growth of trichoderma harzianum from the alginate pellets[J]. Phytopathology, 1990, 90 (1): 724-727.

[23] Nigam P S, Pandey A. Biotechnology for agro-industrial residues utilization: utilisation of agro-residues[M]. Springer Science + Business Media B. V. 197-216.

[24] 柳芳, 田伟, 李凌之, 等. 生防枯草芽孢杆菌SQR9固体发酵生产生物有机肥的工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(1): 90-95.
Liu F, Tian W, Li L Z *et al*. Optimization of solid-state fermentation conditions for antagonistic *Bacillus subtilis* SQR9 producing bio-organic fertilizer[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(1): 90-95.

[25] 穆燕魁, 王占武, 张翠绵, 等. 根际益生菌链霉菌S506固体发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1600-1605.
Mu Y K, Wang Z W, Zhang C M *et al*. Optimum of solid fermentation parameters for *Streptomyces* sp. S506[J]. Microbiology China, 2008, 35(10): 1600-1605.

[26] 兰时乐, 毛小伟, 肖调义, 等. 菜籽粕混合菌固体发酵脱毒条件的响应面优化研究[J]. 动物营养学报, 2013, 25(3): 609-619.
Lan S L, Mao X W, Xiao T Y *et al*. Detoxification conditions of solid state fermentation from rapeseed meal by mixture strains using response surface methodology [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(3): 609-619.

[27] 任小利, 王丽萍, 徐大兵, 等. 菜粕堆肥与无机肥配施对烤烟产量和品质以及土壤微生物的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(2): 92-98.
Ren X L, Wang L P, Xu D B *et al*. Effects of application of rapeseed cake compost combined with chemical fertilizer on the yield and quality of flue-cured tobacco and soil microorganism [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(2): 92-98.

[28] Coward-Kelly G, Chang V S, Agbogbo F K *et al*. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1 Chicken feathers [J]. Bioresource Technology, 2006, 97: 1337-1343.

[29] 袁玉娟. *Bacillus subtilis* SQR9的黄瓜促生和枯萎病生防效果及其作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2011.
Yuan Y J. Cucumber growth promotion and wilt disease suppression of *Bacillus subtilis* SQR9 and their mechanisms [D]. Nanjing: Ms thesis, Nanjing Agricultural University, 2011.

[30] Näsholm T, Ekblad A, Nordin A *et al*. Boreal forest plants take up organic nitrogen[J]. Nature, 1998, 392: 914-916.

[31] Kinnersley A M, Robert C D, Kinnersley C Y, John M L. Method for increasing fertilizer efficiency [p]. Unite States Patent: 5840656, 1998.