

生防枯草芽孢杆菌 Czk1 固体发酵工艺条件优化

贺春萍^{1,2}, 翟纯鑫^{2*}, 吴 贺³, 梁艳琼¹, 谭施北¹, 吴伟怀¹, 易克贤^{1,2**}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/农业农村部热带农业绿色低碳重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095; 3. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201

摘 要: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Czk1 是一株具广谱拮抗、促生和诱导植株产生抗病性的根际益生菌。为了全面资源化利用农业废弃物中的有机养分和促进对植物土传病害的生物防治, 本研究以 Czk1 为研究对象, 以鸡粪为底肥, 分别利用玉米秸秆、菌糠、椰糠堆肥为原料, 采用液固两相发酵工艺, 以稀释平板菌落计数法测定活菌总数和芽孢数, 经过单因素和正交试验方法, 明确 Czk1 固体发酵物料的配方、工艺参数和培养条件。得出 Czk1 固体发酵的最优条件: 最佳原料为菌糠鸡粪堆肥, Czk1 接种重量为 10%, 黄豆粉添加量为 10%, 含水量为 40%, 发酵温度为 37 °C, 翻抛 1 次/72 h, 在此条件下, Czk1 菌株中的芽孢活菌数量总量可以达到 8.63×10^8 CFU/g, 芽孢数为 8.37×10^8 CFU/g。其次, 发酵效果较佳的原料为秸秆鸡粪堆肥, Czk1 接种量为 10%, 添加 5% 黄豆粉, 40% 含水量, 发酵温度为 37 °C, 翻抛 1 次/72 h, 此条件下, Czk1 接种菌株中的活菌数量总量可达到 6.53×10^8 CFU/g, 芽孢数为 5.97×10^8 CFU/g; 另外, 在此配方条件下再添加 30% 菌糠, Czk1 菌株的活菌数量总量及芽孢数分别可达到 8.70×10^8 CFU/g 和 6.90×10^8 CFU/g。4 种发酵生物肥原料的理化性质测定表明, 其有机质含量、碳氮比均有较大差异, 其中以鸡粪为原料其 pH、全磷和全钾含量均最高, 碳氮比最低, 氮、磷、钾总含量均高于秸秆、椰糠和菌糠; 秸秆为原料其电导率、有机质含量最高; 椰糠为原料其全氮含量最高, 菌糠为原料碳氮比最高。不同鸡粪与菌糠、秸秆及椰糠组合的生物有机肥的种子发芽指数均大于 80%。因此, 枯草芽孢杆菌 Czk1 具有良好的开发利用价值, 选择合适的发酵生产条件可将农业废弃物制备出高质量的生物有机肥。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 固体发酵; 发酵工艺优化; 生物有机肥; 芽孢产量

中图分类号: TQ455; S476.1 文献标识码: A

Optimization of Solid-state Fermentation Conditions of Antagonistic *Bacillus subtilis* Czk1

HE Chunping^{1,2}, ZHAI Chunxin^{2*}, WU He³, LIANG Yanqiong¹, TAN Shibe¹, WU Weihua¹, YI Kexian^{1,2**}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Key Laboratory of Low Carbon Green Agriculture in Tropical China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 3. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

Abstract: *Bacillus subtilis* Czk1 is a rhizosphere antagonist with a very broad-spectrum antagonistic, growth promotion and induction of plant resistance. In order to fully utilize organic nutrients in agricultural wastes and promote biological control of soil-borne plant diseases, Czk1 was used as the research object in this study, chicken manure as the base fertilizer, corn straw, mushroom bran and coconut bran compost were used as the raw materials, and the liquid-solid

收稿日期 2022-10-13; 修回日期 2022-12-21

基金项目 海南省院士创新平台科研专项 (No. YSPTZX202016); 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC692); 国家天然橡胶产业技术体系病害防控岗位项目 (No. CARS-33-BC1)。

作者简介 贺春萍 (1974—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 植物病理学; *同等贡献作者: 翟纯鑫 (1995—), 男, 硕士, 研究方向: 植物病理学。 **通信作者 (Corresponding author): 易克贤 (YI Kexian), E-mail: yikexian@126.com。

two-phase fermentation process was adopted. The total number of viable bacteria and the number of spores were determined by the dilution plate colony counting method. The formula, process parameters and culture conditions of Czkl solid fermentation materials were determined by the single factor and orthogonal experiment method. The results showed that the optimal conditions for solid fermentation of Czkl are raw material was mushroom bran and chicken manure compost with the inoculated weight of Czkl at 10%, the added amount of soybean powder at 10%, the water content at 40%, the fermentation temperature at 37 °C and the turning once every 72 h. Under the conditions, the total number of viable bacteria in Czkl strain could reach 8.63×10^8 CFU/g. The number of spores was 8.37×10^8 CFU/g. The best fermentation material was corn straw and chicken manure compost, Czkl inoculation amount of 10%, adding 5% soybean powder, 40% water content, fermentation temperature of 37 °C, turning once every 72 h, the total number of viable bacteria in Czkl inoculation strain could reach 6.53×10^8 CFU/g. The number of spores was 5.97×10^8 CFU/g. The total number of viable bacteria and the number of spores of Czkl strain could reach 8.70×10^8 CFU/g and 6.90×10^8 CFU/g, respectively, when 30% mushroom bran was added. The physical and chemical properties of four fermentation biological fertilizer raw materials were determined, and significant differences were observed in their organic matter content and carbon to nitrogen ratio. Among them, chicken manure had the highest pH, total phosphorus, and total potassium content, while the carbon to nitrogen ratio was the lowest. The total content of nitrogen, phosphorus, and potassium was higher than that of corn straw, coconut bran, and mushroom bran; Corn straw has the highest electrical conductivity and organic matter content as the raw material; Coconut bran has the highest total nitrogen content, while mushroom bran has the highest carbon to nitrogen ratio. The seed germination index of bio-organic fertilizer with different combinations of chicken manure, mushroom bran, corn straw, and coconut bran is greater than 80%. Therefore, high quality bioorganic fertilizer can be prepared from agricultural waste by selecting suitable fermentation production conditions. *B. subtilis* Czkl has good development and utilization value.

Keywords: *Bacillus subtilis*; solid-state fermentation; fermentation condition optimization; bio-organic fertilizer; spore production

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.02.019

橡胶树根病广泛分布于世界各植胶区，其中以热带地区东南亚国家发生较为严重，在我国以海南和云南主要植胶区发生较为普遍，该病害是限制我国天然橡胶产量提高的重要生物因子^[1]。目前，国内发现的 7 种类型根病中，以红根病发病率最高（10%~40%）和分布最为广泛，若未及时防治，病株死亡率可达 100%^[2]。由土传病害病原橡胶树灵芝菌（*Ganoderma pseudoferreum*）引起的红根病可侵染橡胶树根颈部，能引起根部腐烂，发生严重时植株枯萎死亡。一直以来，生产上防治橡胶树红根病多数以化学药剂十三吗啉灌根为主，但长期单一施用此杀菌剂存在药剂成本高、病原菌耐药性、防效下降及对胶林生态不安全等一系列问题^[3]。利用生防技术治理土传病害因具有高效、安全、环保等诸多优势日益受到人们的重视，利用有益微生物制备生物有机肥在防治植物土传病害研究中取得了许多研究成果^[4-9]。因此，筛选高效、安全的植物根际促生菌及拮抗微生物，开发具良好防效、环保的微生物肥料具有重要的现实意义。

利用已腐熟有机肥添加有益微生物二次发酵制备生物有机肥，其中应用最为广泛的微生物菌

株为芽孢杆菌属（*Bacillus*），因其具有拮抗病原菌、促生、抗逆及产生芽孢的功能而广受各大生物有机肥生产企业的青睐。但受制于肥料中功能菌活菌数的限制，肥料的质量良莠不齐，因此迫切需要提升肥料中的活菌数来提升肥料质量。有研究表明，在鸡粪堆肥过程中添加菌剂^[10-11]、玉米秸秆^[10, 12-13]、菌糠（蘑菇渣）^[12, 14-16]、椰糠^[17]、木屑^[18]、香蕉茎叶^[19]、菠萝茎叶^[20]等均可改善堆肥质量。资源化利用多种农业废弃物而腐熟有机肥，我国每年可产生秸秆、中药渣、牛粪、猪粪等废弃物约 6000 万 t，充分利用这些有机养分资源，可以减少化肥的投入和对环境的污染，大幅度地提高土壤的有机质含量，并且可以改善土壤的生物活性^[21]。

枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）Czkl 分离自橡胶树根际，其具有促生、拮抗和增强植株抗病性的特性，对根病、炭疽病、白粉病等多种橡胶树病害均有较强的拮抗作用^[22-24]，该菌株能分泌多种脂肽类抗菌物质^[25]和产生 33 种挥发性物质^[26]，并可与化学杀菌剂协同抑制橡胶树根病原^[3]，应用潜力大。本课题组前期通过研究 Czkl 菌株的液体发酵条件获得优化培养基组分和最佳培养参

数,使 Czkl 菌株的生长量得到了显著提高^[27],但菌液难以大规模保存和实现产业化,而研究固体菌剂不仅能提供相同的菌量,还具有货架期长、可长期发挥生防功能等优势。为了实现 Czkl 菌株的产业化,本研究对枯草芽孢杆菌 Czkl 的固体发酵条件进行优化,探究各发酵条件下活菌量及芽孢数量的变化情况,为后期生产制备生物肥料提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试原料:腐熟鸡粪购于丰润农资超市,金针菇菌糠购于连云港贝森生物科技有限公司,椰糠购于中国热带农业科学院农资公司,玉米秸秆粉购于联丰农产品深加工公司。

供试培养基^[28]:LB 液体培养基、LA 培养基。

供试生防菌株:枯草芽孢杆菌 Czkl,由笔者所在实验室分离、鉴定和保藏。

1.2 方法

1.2.1 生防菌株接种液的制备 将冷冻保存的生防菌株 Czkl 转接于 LA 培养基平板,然后置于 37℃ 培养箱中培养 48~72 h;挑取 Czkl 菌株单个菌落于 LB 液体培养基中,于 37℃、180 r/min 条件下培养 12~16 h,制成 Czkl 菌液,终浓度约 10^8 CFU/mL。

1.2.2 固体发酵载体的筛选 分别选取菌糠、秸秆和椰糠为发酵载体,采用 250 mL 三角瓶固体发酵培养^[28],以腐熟鸡粪为底肥,将菌糠、秸秆和椰糠添加量分别设为 0、33%、38%、41%和 100%。原料均粉碎过 20 目筛,三角瓶内装 40 g 不同配比的鸡粪堆肥,置于 121℃、30 min 条件下间歇性灭菌 2 次,于鸡粪堆肥中接入 5% Czkl 种子液,使用无菌水调节含水量至 40%,置于 30℃ 培养箱中静置发酵 7 d,每隔 24 h 翻抛 1 次,每处理重复 3 次。统计 Czkl 活菌数及芽孢数。

1.2.3 固体发酵条件优化 根据 1.2.2 的试验结果,以最优固体发酵载体为基础,进一步优化 Czkl 菌株的固体发酵条件。

优化 Czkl 菌株接种量:于鸡粪堆肥中分别接入为 5%、10%、15% (m/m) 的 Czkl 菌株发酵液,含水量调节至 40%,每 24 h 翻抛 1 次,于 30℃ 培养箱中静置发酵 7 d,每处理重复 3 次。统计 Czkl 活菌数及芽孢数。

优化黄豆粉添加量:于鸡粪堆肥中分别添加

为 0、5%、10% (m/m) 的黄豆粉,调节含水量为 40%,每 24 h 翻抛 1 次,于 30℃ 培养箱中静置发酵 7 d,每个处理重复 3 次。统计 Czkl 活菌数及芽孢数。

固体发酵条件正交试验:于鸡粪堆肥中接入 10% Czkl 菌株接种量,添加 10% 黄豆粉,检测不同含水量 (30%、40%、50%)、培养温度 (20、30、37℃) 和翻抛时间 (24、48、72 h 各 1 次) 对 Czkl 菌体总量和芽孢的影响。每处理重复 3 次,置于相应条件下静置 7 d。统计 Czkl 活菌数及芽孢数。

堆肥辅料配方优化:于筛选出的最佳比例秸秆鸡粪堆肥中分别添加 0、10%、20%、30%、40% (m/m) 菌糠,于 37℃ 培养箱中静置发酵 7 d,每隔 72 h 翻抛 1 次;于筛选出的最佳比例菌糠鸡粪堆肥中分别添加 0、10%、20%、30%、40% (m/m) 秸秆,于 37℃ 培养箱静置发酵 7 d,每隔 72 h 翻抛 1 次。每处理重复 3 次。统计 Czkl 活菌数和芽孢数。

采用无菌水系列稀释平板涂布计数法统计 Czkl 活菌数和芽孢数,三角瓶中加入 90 mL 无菌水,放入 10 颗玻璃珠,取 10 g 生物有机肥加至三角瓶中,置于 180 r/min 条件下震荡培养 30 min,系列稀释,取 100 μ L 稀释液涂布于平板,置于 37℃ 培养箱过夜培养并进行菌落计数。将悬浮液放于 80℃ 温度下水浴处理 20 min,再依照稀释平板菌落计数法计算芽孢数量^[29]。

1.2.4 原料及生物有机肥理化性质检测 pH 及电导率 (EC) 测定:样品与去离子水按 1:10 (m/V) 混合均匀,置于水平摇床上震荡 2 h,静置 30 min 后用 pH 计 (FE28-Standard, 瑞士) 和电导率仪 (FE30K, 瑞士) 分别测定 pH 及 EC。样品经浓硫酸-过氧化氢消煮,采用凯氏定氮仪 (海能 K9840, 山东) 测定全氮含量;采用火焰光度计 (M410, 英国) 测定全钾含量;采用钒钼黄比色法测定全磷含量;采用元素分析仪 (EA2400-II, 英国) 测定有机质含量。

1.2.5 发芽指数测定 取单因素试验有机肥样品测定种子发芽指数,以表明其物料腐熟度及有机肥毒性。具体方法:黄瓜种子 (博优青瓜王 308F1) 置于 60℃ 热水中烫种 10 min,用 2% 次氯酸钠消毒 3 min,用蒸馏水冲洗 3~4 次。在培养皿中均匀放入 20 颗种子,种子下垫 2 张灭菌滤纸。将已测定 pH 与 EC 的有机肥过滤,在放有种子的培养皿

中加入 5 mL 滤液，置于 28 ℃ 培养箱中黑暗培养 48 h，统计发芽种子数，测定根长，计算发芽率和发芽指数，每个处理重复 3 次。用蒸馏水培养作对照。发芽率=(发芽种子数/供试种子总数)×100%；发芽指数 (GI) =(样品发芽率×平均根长)/(对照发芽率×平均根长)×100%。

1.3 数据处理

利用 Excel 2016 和 SPSS 25.0 软件进行数据统计与分析，采用 Duncan’s 新复极差法检验处理间的差异显著水平 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 4 种原料的理化特性

4 种原料的理化性质测定结果表明 (表 1)，4 种原料中腐熟鸡粪的 pH 最高，椰糠的 pH 最低；电导率、全氮含量相差不大，电导率最高和最低的原料分别为秸秆和椰糠，全氮含量的最高为椰糠，其他 3 种原料的全氮含量相差不大；鸡粪的

全磷含量、全钾含量均最高，而椰糠的全磷含量、全钾含量均较低；秸秆的有机质含量最高，有机质含量最低的原料为鸡粪；菌糠的碳氮比最高，最低为腐熟鸡粪。腐熟鸡粪中氮、磷、钾总含量高于其他 3 种原料。

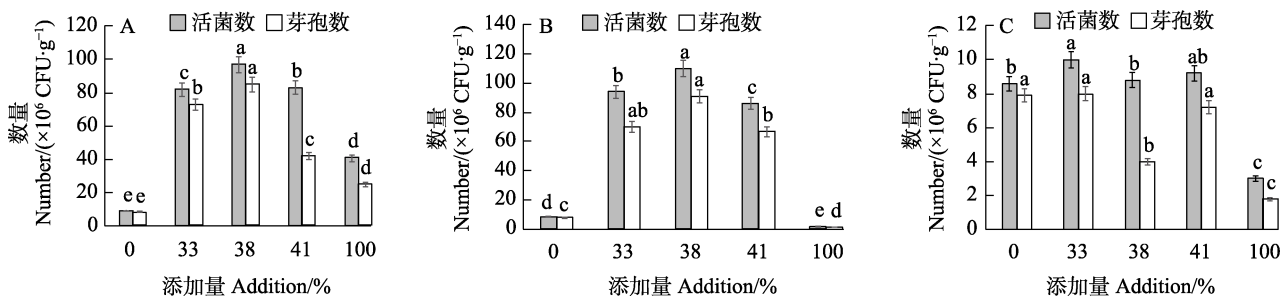
2.2 载体种类及对比对 Czkl 液体发酵的影响

通过研究菌糠、秸秆、椰糠与鸡粪不同配比对比 Czkl 液体发酵的影响，结果表明，添加量 < 41% 时，随着菌糠、秸秆添加量的增加，Czkl 的活菌数及芽孢数均逐渐增加，但当菌糠、秸秆的添加量 ≥ 41% 时，发酵后 Czkl 的活菌数、芽孢数均逐渐减少 (图 1A、图 1B)。因此，菌糠和秸秆添加的最适合比例均为 38%，在此添加量下 Czkl 活菌量及芽孢数达最大值。而椰糠的适宜添加量为 33%，在此添加量下 Czkl 活菌量及芽孢数达最大值 (图 1C)。与菌糠、秸秆相比，添加椰糠并未显著促进活菌量及芽孢量的增加，因此，不适宜添加椰糠进行 Czkl 菌株生物有机肥的发酵。

表 1 4 种原料的理化性质
Tab. 1 Physical and chemical properties of four raw materials

原料 Raw material	pH	电导率 EC/(s·m ⁻¹)	全氮 Total N/%	全磷 Total P/%	全钾 Total K/%	有机质 Organic matter/%	碳氮比 C/N
鸡粪	7.01±0.29 ^a	2.92±0.00 ^c	1.55±0.05 ^b	3.10±0.00 ^a	2.70±0.20 ^a	43.10±0.83 ^d	16.13±0.32 ^d
秸秆	5.40±0.23 ^b	3.80±0.01 ^a	1.47±0.06 ^{bc}	0.37±0.06 ^c	1.90±0.08 ^b	95.88±0.19 ^a	37.83±0.07 ^b
菌糠	5.45±0.04 ^b	3.03±0.00 ^b	1.40±0.00 ^c	1.43±0.06 ^b	1.27±0.06 ^c	93.70±0.17 ^b	38.82±0.07 ^a
椰糠	4.42±0.05 ^c	2.86±0.05 ^c	1.99±0.05 ^a	0.20±0.03 ^d	1.51±0.03 ^d	84.70±0.17 ^c	24.69±0.05 ^c

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).



A: 菌糠; B: 秸秆; C: 椰糠。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
A: Mushroom residue; B: Corn straw; C: Coconut residue. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 1 载体种类及对比对 Czkl 发酵的影响

Fig. 1 Effects of carrier types and ratios on Czkl fermentation

2.3 Czkl 生物有机肥对种子发芽的影响

利用不同堆肥原料制备的 Czkl 生物有机肥浸出液测定黄瓜种子的发芽指数，结果表明，48 h 后，除秸秆添加 100% 的处理外，其余生物有机肥浸出液的发芽指数均达 80% 以上 (图 2)。秸秆添

加比例为 100% 处理的发芽指数仅 60% 左右，不利于种子的萌发。

2.4 Czkl 固体发酵条件优化

2.4.1 菌糠鸡粪堆肥最佳发酵参数筛选 (1)
Czkl 接种量和黄豆粉添加量的优化。结果如图 3

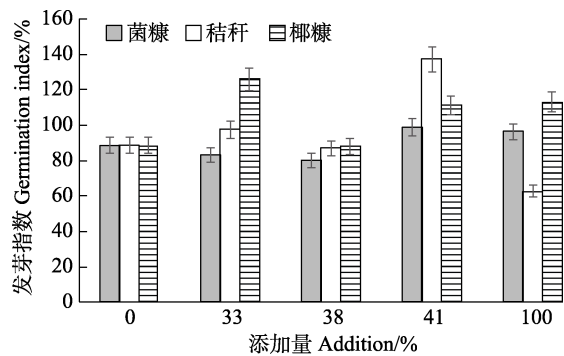
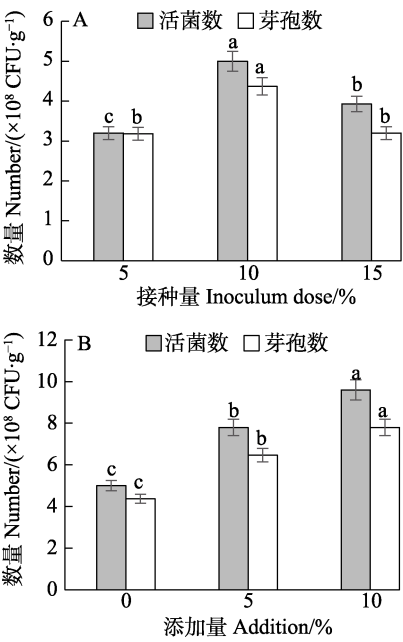


图 2 不同生物有机肥浸提液下的种子发芽指数
Fig. 2 Seed germination index under different bio-organic fertilizer extracts

所示,接种量 < 15% 时,随着 Czk1 接种量的逐渐增大, Czk1 活菌数及芽孢数均逐渐增加,但当 Czk1 接种量为 15% 时, Czk1 活菌数及芽孢数均有所下降(图 3A),因此,在菌糠鸡粪生物肥发酵中 Czk1 接种量以 10% 较适宜。随着黄豆粉添加量的增加, Czk1 活菌数及芽孢数均逐渐增加(图 3B),表明在菌糠鸡粪堆肥中最适宜的黄豆粉添加量为 10%。

(2) 培养温度、含水量和翻抛时间的正交组合优化。由表 2、表 3 极差分析结果发现,对 Czk1 总菌数和芽孢数量影响最大的因素为培养温度,极差分别为 3.90 和 4.32,含水量和翻抛时间的影响较小。在试验设置的发酵温度范围内,当温度逐渐上升,发酵的菌量和芽孢数量逐渐增高。不同含水量对发酵后 Czk1 的总菌量和芽孢数均有影响,当温度在 20 ℃ 和 30 ℃ 时,低、中含水量间的差异大于中、高含水量间的差异。在翻抛时间上,每 24 h 翻抛 1 次的 Czk1 总菌数和芽孢数均低于其余处理。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 3 Czk1 接种量 (A) 和黄豆粉添加量 (B) 对菌糠鸡粪堆肥发酵的影响

Fig. 3 Effects of inoculum dose of Czk1 (A) and supplementation of soybean powder (B) on the fermentation of chicken manure and mushroom residue compost

由表 2、表 3 可以看出,菌糠鸡粪堆肥中最佳发酵条件组合为:培养温度为 37 ℃,物料含水量为 40%,每 72 h 翻抛 1 次,发酵后的总菌数为 8.63×10^8 CFU/g,芽孢数为 8.37×10^8 CFU/g。

2.4.2 秸秆鸡粪堆肥最佳发酵参数筛选 (1) Czk1 接种量和黄豆粉添加量的优化。从图 4 可看出,接种量 < 15% 时,随着 Czk1 接种量的逐渐增大,活菌数及芽孢数均逐渐增加,但当接种量为 15% 时, Czk1 活菌数及芽孢数均有所下降(图

表 2 菌糠鸡粪堆肥中 Czk1 发酵条件正交优化试验结果
Tab. 2 Orthogonal experimental statistical results for Czk1 strain fermentation condition in compost of chicken manure and mushroom residue

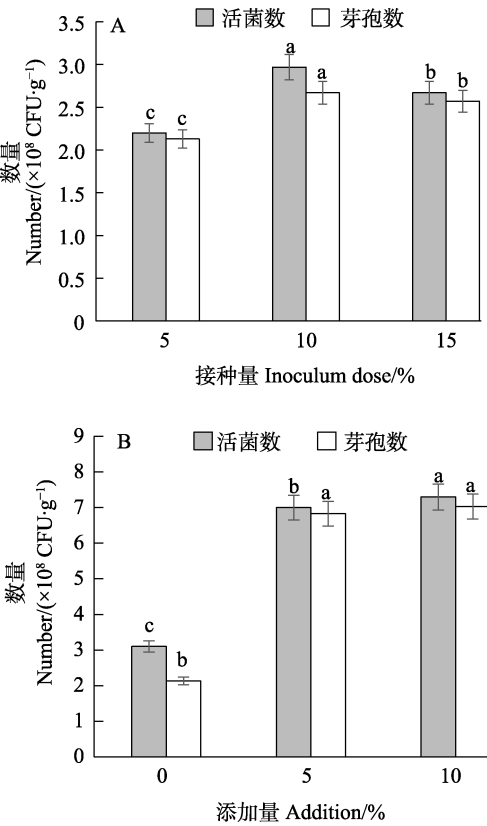
序号 No.	温度 Temperature/℃	含水量 Water content/%	翻抛时间 Time of turning over/h	总菌数 Total bacterial count ($\times 10^8$ CFU·g ⁻¹)	芽孢数 Number of spore ($\times 10^8$ CFU·g ⁻¹)
1	20	30	24	0.97±0.15	0.80±0.10
2	20	40	48	4.60±0.10	3.60±0.36
3	20	50	72	4.37±0.15	3.13±0.25
4	30	30	72	6.10±0.00	5.33±0.86
5	30	40	24	7.00±0.70	5.83±0.23
6	30	50	48	5.77±0.55	5.57±0.67
7	37	30	48	7.00±0.20	6.77±0.23
8	37	40	72	8.63±0.32	8.37±0.32
9	37	50	24	6.00±0.46	5.37±0.15

表 3 菌糠鸡粪堆肥中 Czkl 发酵条件优化的正交结果评价

Tab. 3 Evaluate of orthogonal experimental for Czkl strain culture conditions in compost of chicken manure and mushroom residue

指标 Index	项目 Item	温度 Tempera- ture	含水量 Water content	翻抛时间 Time of turning over
总菌数 $/(\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1})$	B ₁	3.31	4.69	4.66
	B ₂	6.29	6.74	5.79
	B ₃	7.21	5.38	6.37
	极差 R	3.90	2.05	1.71
芽孢数 $/(\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1})$	B ₁	2.51	4.30	4.00
	B ₂	5.58	5.93	5.31
	B ₃	6.83	4.69	5.61
	极差 R	4.32	1.63	1.61

注：B₁、B₂、B₃ 分别代表在培养温度、含水量和翻抛时间发酵后 Czkl 活菌数的平均值。
Note: B₁, B₂ and B₃ represent the average of bacterial number of Czkl after fermentation under culture temperature, water content and time of turning over, respectively.



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 4 Czkl 接种量 (A) 和黄豆粉添加量 (B) 对秸秆鸡粪堆肥发酵的影响
Fig. 4 Effects of dose of Czkl (A) and supplementation of soybean powder (B) on the fermentation of chicken manure and corn straw compost

4A), 因此, 在秸秆鸡粪生物肥发酵中 Czkl 菌株的接种量以 10% 较适宜。随着黄豆粉添加量的增加, Czkl 活菌数及芽孢数均逐渐增加, 5% 与 10% 添加量之间差异不显著 (图 4B), 为节约成本, 在秸秆鸡粪堆肥中选择最适宜的黄豆粉添加量为 5%。

(2) 培养温度、含水量和翻抛时间的正交组合优化。由表 4、表 5 的极差分析结果发现, 影响 Czkl 总菌数和芽孢数的主要因素为培养温度, 极差分别为 2.81 和 3.57, 含水量和翻抛时间的影响较小。在试验设置的温度范围内, 随着温度的升高, Czkl 活菌数和芽孢数逐渐增大。不同含水量对 Czkl 总菌数和芽孢数均有一定的影响, 除 37℃, 温度在 20℃ 和 30℃ 时, 低、中含水量间的差异大于中、高含水量间的差异。在翻抛时间因素方面, 每 72 h 翻抛 1 次发酵后的 Czkl 总菌数大于其余处理, 每 48、72 h 翻抛 1 次发酵后的 Czkl 芽孢数高于每 24 h 翻抛 1 次处理。

由表 4、表 5 可知, 秸秆鸡粪堆肥中最佳发酵条件为: 培养温度为 37℃, 物料含水量为 40%, 每 72 h 翻抛 1 次, 发酵后的活菌数为 $6.53 \times 10^8 \text{ CFU/g}$, 芽孢数为 $5.97 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ 。
2.4.3 堆肥辅料配方的优化 (1) 添加秸秆对菌糠鸡粪肥 Czkl 发酵的影响。在菌糠鸡粪中分别添加 0%、10%、20%、30%、40% 秸秆, 于 37℃ 培养箱中静置发酵 7 d, 每 72 h 翻抛 1 次。结果表明, 随着秸秆添加量的增加, 发酵后的 Czkl 活菌数及芽孢数均逐渐减少, 表明菌糠鸡粪发酵中不适宜添加秸秆 (图 5A)。

(2) 添加菌糠对秸秆鸡粪肥 Czkl 发酵的影响。于秸秆鸡粪堆肥中分别添加 0%、10%、20%、30%、40% 菌糠, 于 37℃ 培养箱中静置发酵 7 d, 每 72 h 翻抛 1 次。结果表明, 随着菌糠添加量的增加, 发酵后的 Czkl 活菌数及芽孢数也随之增加, 但当菌糠添加量超过 30% 时, 发酵后的 Czkl 活菌数及芽孢数有所减少 (图 5B)。因此, 添加菌糠比例为 30% 时, 活菌数及芽孢数均达最大。

2.5 Czkl 发酵生物有机肥的理化性质

通过测定 Czkl 发酵生物有机肥的理化性质 (表 6), 结果表明, 3 种生物有机肥中鸡粪菌糠肥的全氮、全磷、全钾、有机质含量均最高, 而鸡粪秸秆肥的全氮、全磷、全钾、有机质含量均最低; 鸡粪秸秆肥的碳氮比最高, 鸡粪菌糠肥的碳氮比最低。总体而言, 3 种生物有机肥的理化

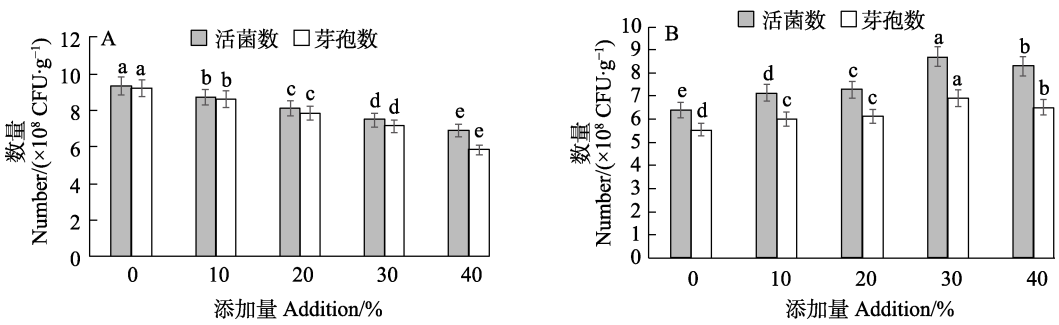
表 4 秸秆鸡粪堆肥中 Czk1 发酵条件优化正交试验结果
Tab. 4 Orthogonal experimental statistical results for Czk1 strain fermentation condition in compost of chicken manure and corn straw

序号 No.	温度 Temperature/℃	含水量 Water content/%	翻抛时间 Time of turning over/h	总菌数 Total bacterial count /($\times 10^8$ CFU·g $^{-1}$)	芽孢数 Number of spore /($\times 10^8$ CFU·g $^{-1}$)
1	20	30	24	2.70±0.26	0.40±0.20
2	20	40	48	2.93±0.21	2.13±0.25
3	20	50	72	2.50±0.30	2.03±0.15
4	30	30	72	4.80±0.10	3.37±0.35
5	30	40	24	5.80±0.61	4.97±0.80
6	30	50	48	4.23±0.25	4.20±0.26
7	37	30	48	5.43±0.71	4.97±0.15
8	37	40	72	6.53±0.45	5.97±0.38
9	37	50	24	4.60±0.52	4.33±0.47

表 5 秸秆鸡粪堆肥中 Czk1 发酵条件优化正交试验结果评价
Tab. 5 Evaluate of orthogonal experimental for Czk1 strain culture conditions in compost of chicken manure and corn straw

指标 Index	项目 Item	温度 Temperature	含水量 Water content	翻抛时间 Times of turning over
总菌数/($\times 10^8$ CFU·g $^{-1}$)	B ₁	2.71	4.31	4.37
	B ₂	4.94	5.09	4.20
	B ₃	5.52	3.78	4.61
	极差 R	2.81	1.31	0.41
芽孢数/($\times 10^8$ CFU·g $^{-1}$)	B ₁	1.52	2.91	3.23
	B ₂	4.18	4.36	3.77
	B ₃	5.09	3.52	3.79
	极差 R	3.57	1.45	0.56

注：B₁、B₂、B₃ 分别代表在培养温度、含水量和翻抛时间发酵后 Czk1 活菌数的平均值。
Note: B₁, B₂ and B₃ represent the average of bacterial number of Czk1 after fermentation under culture temperature, water content and time of turning over, respectively.



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 5 秸秆 (A) 和菌糠 (B) 添加量对鸡粪堆肥发酵的影响
Fig. 5 Effects of supplementation of corn straw (A) and mushroom residue (B) on the fermentation of chicken manure compost

性质有一定差异，并且 3 种生物有机肥总养分均在 6%以上，均符合生物有机肥的要求。

3 讨论

近年来，作为生防产品的枯草芽孢杆菌受到

广泛应用，而随着使用量和生产量的增大，如何有效提高产品质量、降低生产成本显得尤为重要。通过优化培养基配方和培养条件来提高枯草芽孢杆菌的芽孢产量是降低生产成本的重要手段。目前，枯草芽孢杆菌大多采用液体深层发酵来生产

表 6 3 种生物有机肥的理化性质
Tab. 6 Physical and chemical properties of three bio-organic fertilizers

生物有机肥 Bio-organic fertilizer	全氮 Total N/%	全磷 Total P/%	全钾 Total K/%	有机质 Organic matter/%	碳氮比 C/N
鸡粪秸秆肥	1.60±0.03 ^c	2.41±0.10 ^b	2.12±0.07 ^c	54.12±0.11 ^c	19.62 ^a
鸡粪菌糠肥	2.12±0.11 ^a	2.83±0.00 ^a	2.60±0.01 ^a	60.31±0.79 ^a	16.50 ^c
鸡粪秸秆菌糠肥	1.76±0.01 ^b	2.51±0.00 ^b	2.43±0.03 ^b	56.27±0.86 ^b	18.54 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

液体菌剂，但菌液较难保存，且防效不稳定^[30]，而固体菌剂在提供相同菌体数量的同时，还具有运输方便、货架期长等特点，微生物在生长过程中产生的代谢物（抑菌物质）也均保存于发酵培养基中，因而固体菌剂的使用效果明显优于液体菌剂。

固体培养基的配方成分和发酵条件（如发酵温度、时间、接种量、料水比、碳氮比等）都是影响生物菌量和芽孢形成的重要因素，且不同因素间相互影响。接种量大，菌体的繁殖速度快，亦会增加物料的含水量，从而影响菌体的透气性，而接种量小，菌体发酵时间较长，会加大污染的风险。物料含水量过高将会影响物料溶氧能力、松散性和散失发酵热量，但含水量过低会降低溶解能力、影响传递和微生物对基质的利用^[31-32]。培养温度过高对微生物会产生有害影响，温度过低会延长发酵时间。C/N 比过高，菌株会因生长缓慢而易被杂菌污染；C/N 比过低，微生物会大量生长产生过量的氨，将抑制菌株生长^[33]。因此，保证发酵效果的关键是摸索出适宜的接种量、发酵温度和物料含水量等。

本研究中采用以鸡粪为底肥的 3 种肥料原料，其有机质含量、碳氮比均有较大差异，以致 Czk1 在 3 种有机肥中的液体发酵效果不同。椰糠有机肥的碳氮比最低，为 24.69，其作为发酵基质时，Czk1 的活菌数和芽孢数也最低。通过添加辅料可调节物料的碳氮比、含水量和孔隙度^[34-35]。因此，本研究通过添加黄豆粉来调节碳氮比，不同用量的黄豆粉会对发酵有明显影响，研究得出黄豆粉最佳添加量为 10%。另外，为了调节发酵原料的碳氮比和有机质，还进行了 3 种有机肥不同原料配比的优化试验，研究表明，未添加黄豆粉，混合较单一的有机肥更利于 Czk1 菌株的生长繁殖，生产获得高质量微生物有机肥。

种子发芽指数（GI）是通过测定植物毒性来

判断堆肥腐熟度的指标。通常 $GI>60\%$ ，基本腐熟； $GI>80\%$ ，完全腐熟^[34]。在本研究中，通过检测不同配比的 Czk1 生物有机肥浸提液对黄瓜种子发芽的影响结果显示，48 h 后，除添加 100% 秸秆处理的种子发芽率仅 60% 毒性相对较大外，其余生物有机肥发酵后浸出液的种子发芽率均达到 80% 以上。综上表明，农业废弃物通过选择适宜的工艺条件制备高质量的生物有机肥是完全可行的。

本研究表明，Czk1 固体发酵的最佳条件：以菌糠鸡粪堆肥为发酵原料，添加 10% 黄豆粉，Czk1 接种量 10%，含水量为 40%，发酵温度为 37℃，每 72 h 翻抛 1 次，发酵后 Czk1 活菌数为 8.63×10^8 CFU/g，芽孢数为 8.37×10^8 CFU/g；以秸秆鸡粪堆肥为发酵原料，添加 5% 黄豆粉，Czk1 接种量 10%，含水量为 40%，发酵温度为 37℃，每 72 h 翻抛 1 次，发酵后 Czk1 活菌数为 6.53×10^8 CFU/g，芽孢数为 5.97×10^8 CFU/g；在以上配方下添加 30% 菌糠，发酵后 Czk1 活菌数及芽孢数分别可达到 8.70×10^8 、 6.90×10^8 CFU/g。这一研究结果与柳芳^[36]利用枯草芽孢杆菌 SQR9 发酵菜粕堆肥的培养条件基本一致，但柳芳在猪粪堆肥、牛粪堆肥和中药渣堆肥发酵中的含水量和翻抛时间与本研究有较大差异，究其原因可能是不同的畜禽粪便特性不同，以致研制生物有机肥的条件有可能存在差异^[29, 36]。目前，本研究仅在小瓶量培养水平上开展枯草芽孢杆菌 Czk1 的固体发酵工艺研究，要实现产业化开发应用，还有待开展该菌剂的田间应用及固体反应器条件的放大试验。

参考文献

[1] 中国农业科学院植物保护研究所，中国植物保护学会. 中国农作物病虫害(第三版下册)[M]. 北京：中国农业出版社，2015: 212-215.
Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China Society of Plant Protection. Crop dis-

- eases and insect pests in China (Ⅱ)(3rd Edition)[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015: 212-215. (in Chinese)
- [2] 贺春萍, 李锐, 梁艳琼, 吴伟怀, 黄兴, 习金根, 郑金龙, 易克贤. 不同地区橡胶树红根病菌的生物学特性及室内毒力测定[J]. 热带作物学报, 2019, 40(3): 522-529.
HE C P, LI R, LIANG Y Q, WU W H, HUANG X, XI J G, ZHENG J L, YI K X. Biological characteristics and toxicity test of pathogen strains causing rubber red root rot from different regions[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(3): 522-529. (in Chinese)
- [3] 谢立, 贺春萍, 梁艳琼, 李锐, 翟纯鑫, 吴伟怀, 郑金龙, 易克贤. 枯草芽孢杆菌 Czk1 与化学杀菌剂协同防治橡胶树根病[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1625-1633.
XIE L, HE C P, LIANG Y Q, LI R, ZHAI C X, WU W H, ZHENG J L, YI K X. Synergistic effect of fungicides and *Bacillus subtilis* Czk1 against rubber root diseases[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1625-1633. (in Chinese)
- [4] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 徐阳春, 黄启为, 沈其荣. 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, XU Y C, HUANG Q W, SHEN Q R. Control of *Fusarium* wilt of watermelon by nursery application of bioorganic fertilizer[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2009, 15(5): 1136-1141. (in Chinese)
- [5] 何欣, 郝文雅, 杨兴明, 沈其荣, 黄启为. 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, SHEN Q R, HUANG Q W. Effects of bioorganic fertilization on growth and controlling *Fusarium*-wilt disease of banana[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2010, 16(4): 978-985. (in Chinese)
- [6] 周新根, 朱宗源, 汪树俊. 辅以拮抗微生物的有机添加剂对蔬菜土传病原菌的生物防治作用[J]. 上海农业学报, 1994, 10(4): 53-58.
ZHOU X G, ZHU Z Y, WANG S J. Effect of organic amendment coated with antagonistic microorganisms on biological control for soil borne pathogens on vegetables[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 1994, 10(4): 53-58. (in Chinese)
- [7] 常志州, 马艳, 黄红英, 叶小梅, 张建英. 辅以拮抗菌的有机肥对辣椒疫病生防效果的研究[J]. 土壤肥料, 2005(2): 28-30.
CHANG Z Z, MA Y, HUANG H Y, YE X M, ZHANG J Y. Efficacy of compost riched with fungi F-310 against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2005(2): 28-30. (in Chinese)
- [8] 肖相政, 刘可星, 廖宗文. 生物有机肥对番茄青枯病的防治研究及机理初探[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(11): 2368-2373.
XIAO X Z, LIU K X, LIAO Z W. Disease-control effect and mechanism research of biological organic fertilizer on tomato bacterial wilt[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(11): 2368-2373. (in Chinese)
- [9] 陈谦, 张新雄, 赵海, 官家发. 生物有机肥中几种功能微生物的研究及应用概况[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2): 294-300.
CHEN Q, ZHANG X X, ZHAO H, GUAN J F. Advance in research and application of some functional microbes in bio-organic fertilizer[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental, 2010, 16(2): 294-300. (in Chinese)
- [10] 周忠雄. 不同菌剂及调理剂对鸡粪堆肥的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
ZHOU Z X. The influence of different bacteria agent and conditioners for chicken manure composting[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [11] 刘羽莲. 鸡粪有机肥发酵及应用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
LIU Y L. Fermentation and application of chicken manure organic fertilizer[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [12] 李吉进. 畜禽粪便高温堆肥机理与应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
LI J J. Study on mechanism of high temperature composting of livestock manure and its application[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [13] 栾润宇, 李佳佳, 纪艺凝, 闫翠侠, 孙约兵. 高温快速发酵对鸡粪重金属形态分布及有机质含量影响[J]. 中国土壤与肥料, 2020(2): 232-240.
LUAN R Y, LI J J, JI Y N, YAN C X, SUN Y B. Effect of rapid-rate thermophilic fermentation on heavy metal fraction and organic matter content in chicken manure[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2020(2): 232-240. (in Chinese)
- [14] 邢振楠, 刘邦, 刘艳杰. 鸡粪与食用菌废弃料堆肥试验研究[J]. 林业科技, 2019, 44(1): 47-49.
XIN Z N, LIU B, LIU Y J. Experimental study on composting of chicken manure and edible fungi waste[J]. Forestry Science & Technology, 2019, 44(1): 47-49. (in Chinese)
- [15] 张锋, 蒋耀智, 盛吉强, 邱崇文, 钟振芳. 硫酸亚铁添加剂对鸡粪堆肥发酵保氮效果的研究[J]. 畜牧业环境, 2020(10): 6-8.
ZHANG F, JIANG Y Z, SHENG J Q, QIU C W, ZHONG Z F. Effect of FeSO_4 additives on nitrogen retention in chicken manure compost fermentation[J]. Animal Husbandry Environment, 2020(10): 6-8. (in Chinese)
- [16] 潘晓光. 整合宏组学分析畜禽废弃物发酵过程中微生物

- 群落的动态变化[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- PAN X G. The dynamic changes of microbial community in the fermentation process of poultry waste analyzed based on integrated meta-omics[D]. Jinan: Shandong University, 2018. (in Chinese)
- [17] 董存明. 鸡粪—椰糠配比生产有机肥及在甘薯上的肥效研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- DONG C M. The research of composting by ratio of chicken manure-coconut residuum and fertilizer efficiency on sweet potato[D]. Haikou: Hainan University, 2015. (in Chinese)
- [18] 杨恕玲, 侯丽鹏, 翟玉蕊, 张春珍. 菌种和辅料对鸡粪堆肥效果的影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 56-60.
- YANG S L, HOU L P, ZHAI Y R, ZHANG C Z. Effects of bacteria and accessories of chicken manure compost[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(24): 56-60. (in Chinese)
- [19] 匡石滋, 田世尧, 肖维强, 刘传和, 李春雨. 利用香蕉菠萝茎叶工厂化生产复合生物有机肥关键技术研究[J]. 热带农业科学, 2016, 36(2): 44-49.
- KUANG S Z, TIAN S Y, XIAO W Q, LIU C H, LI C Y. Industrialized production technology of complex bio-organic fertilizer by using the stem and leaf of banana and pineapple[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2016, 36(2): 44-49. (in Chinese)
- [20] 匡石滋, 刘传和, 田世尧, 李春雨, 易干军. 香蕉与菠萝茎叶资源肥料化利用模式及技术[J]. 现代农业科技, 2013(15): 253-255.
- KUANG S Z, LIU C H, TIAN S Y, LI C Y, YI G J. Fertilizer utilization model and technology of stem and leaf resources of banana and pineapple[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013(15): 253-255. (in Chinese)
- [21] 董峻. 我国在利用有机肥防治作物土传病害方面取得新成就[J]. 北京农业, 2010(12): 22.
- DONG J. China has made new achievements in the use of organic fertilizers to control soil-borne diseases of crops[J]. Beijing Agriculture, 2010(12): 22. (in Chinese)
- [22] 赵璐璐, 贺春萍, 郑肖兰, 樊兰艳, 郑服丛. 枯草芽孢杆菌 Czk1 菌株对橡胶树根病菌的抑制作用及对炭疽病生防效果研究初报[J]. 南方农业学报, 2011, 42(7): 740-743.
- ZHAO L L, HE C P, ZHENG X L, FAN L Y, ZHENG F C. Effect of *Bacillus subtilis* strain Czk1 on different rubber root pathogens and *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* on rubber leaf[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(7): 740-743. (in Chinese)
- [23] 唐文, 梁艳琼, 许沛冬, 张驰成, 吴伟怀, 郑肖兰, 贺春萍, 易克贤. 枯草芽孢杆菌 Czk1 诱导橡胶树抗病性相关防御酶系研究[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 576-582.
- TAN W, LIANG Y Q, XU P D, ZHANG C C, WU W H, ZHENG X L, HE C P, YI K X. Induction of resistance-related defensive enzymes in *Hevea brasiliensis* by *Bacillus subtilis* Czk1[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(4): 576-582. (in Chinese)
- [24] 尹建行, 贺春萍, 梁艳琼, 李锐, 张营. 枯草芽孢杆菌 Czk1 与化学杀菌剂复配对橡胶树炭疽病和白粉病的防效测定[J]. 特产研究, 2023, 45(3): 65-71.
- YIN J H, HE C P, LIANG Y Q, LI R, ZHANG Y. Control effect of *Bacillus subtilis* Czk1 combined with chemical fungicides against anthracnose and powdery mildew of *Hevea brasiliensis*[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2023, 45(3): 65-71. (in Chinese)
- [25] HE C P, FAN L Y, WU W H, LIANG Y Q, LI R, TANG W, ZHENG X L, XIAO Y N, LIU Z X, ZHENG F C. Identification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* Czk1 isolated from the aerial roots of rubber trees[J]. Genetics and Molecular Research, 2017, 16(1): 1-13.
- [26] 梁艳琼, 唐文, 董文敏, 吴伟怀, 李锐, 习金根, 谭施北, 郑金龙, 黄兴, 陆英, 贺春萍, 易克贤. 枯草芽孢杆菌菌株 Czk1 挥发性物质的抑菌活性及其组分分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11): 2465-2474.
- LIANG Y Q, TANG W, DONG W M, WU W H, LI R, XI J G, TAN S B, ZHENG J L, HUANG X, LU Y, HE C P, YI K X. Antifungal effect and components analysis of volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* Czk1[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(11): 2465-2474. (in Chinese)
- [27] 赵璐璐, 贺春萍, 钱飞燕, 鄢小宁, 郑服丛. 橡胶树内生拮抗细菌菌株 Czk1 的发酵条件优化[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 926-931.
- ZHAO L L, HE C P, QIAN F Y, YAN X N, ZHENG F C. Optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* Czk1, an endophytic antagonistic bacterial strain from rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(5): 926-931. (in Chinese)
- [28] 张志焱, 徐海燕, 杨军方. 枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化[J]. 饲料博览, 2005(9): 34-36.
- ZHANG Z Y, XU H Y, YANG J F. Optimization of solid-state fermentation medium for *Bacillus subtilis*[J]. Feed Review, 2005(9): 34-36. (in Chinese)
- [29] 柳芳, 田伟, 李凌之, 杨兴明, 沈标, 沈其荣. 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, YANG X M, SHEN B, SHEN Q R. 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. (in Chinese)
- [30] 秦娟娟, 闫淑珍, 刘佳. 植物内生细菌固体菌剂对辣椒的

- 促生和防病作用[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 325-329.
- QIN J J, YAN S Z, LIU J. The growth promotion on pepper and control of phytophthora capsici by endophytic bacterium agents[J]. Journal of Plant Protection, 2010, 37(4): 325-329. (in Chinese)
- [31] 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.
- [32] KUNDSSEN G R, LI B. Effects of temperature, soil moisture, and wheat straw on growth of *Trichoderma harzianum* from the alginate pellets[J]. Phytopathology, 1990, 80(1): 724-727.
- [33] 应俊辉. 影响污泥高温好氧堆肥的主要因素及其控制[J]. 丽水学院学报, 2006, 28(5): 59-61.
- YING J H. A discussion on influence factors and control of thermophilic aerobic composting of sludge[J]. Journal of Lishui University, 2006, 28(5): 59-61. (in Chinese)
- [34] 钱晓雍, 沈根祥, 黄丽华, 奚刚. 畜禽粪便堆肥腐熟度评价指标体系研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3): 549-554.
- QIAN X Y, SHEN G X, HUANG L H, XI G. An index system for evaluating the maturity of animal manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(3): 549-554. (in Chinese)
- [35] 吕黄珍, 韩鲁佳, 杨增玲. 猪粪麦秸反应器好氧堆肥工艺参数优化[J]. 农业机械学报, 2008, 39(3): 101-105.
- LYU H Z, HAN L J, YANG Z L. Optimization of aerobic composting parameters on pig slurry-wheat straw reactor[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(3): 101-105. (in Chinese)
- [36] 柳芳. 生防菌 *Bacillus subtilis* SQR9 液体及固体发酵条件优化[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- LIU F. Optimization of conditions for liquid and solid-state fermentation of antagonistic strain *B. subtilis* SQR9[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)