

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2023062604

CSTR:32061.14.hjhx.2023062604

李春霞, 李月月, 李秀芬. 液态复合微生物菌剂的保存技术研究[J]. 环境化学, 2024, 43(12): 4072-4081.

LI Chunxia, LI Yueyue, LI Xiufen. Study on the preservation technology of liquid composite microbial inoculants[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (12): 4072-4081.

液态复合微生物菌剂的保存技术研究*

李春霞^{1,2} 李月月^{1,2} 李秀芬^{1,2}**

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 无锡, 214122; 2. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 苏州, 215009)

摘要 与固态微生物菌剂相比, 液体复合微生物菌剂具有制备方法简单、易保存、运输方便、启动时间短等优点, 可达到快速启动反应器和提高使用效果的目的. 借鉴食品保鲜与保藏等领域的技术手段研发液态复合微生物菌剂的新型保存技术, 可为其规模化生产及实际应用提供重要参考. 研究增稠剂、乳化剂和抗氧化剂对菌剂保存效果的影响规律, 同时进行响应面优化研究. 液态复合微生物菌剂制备的最佳工艺为 0.401% 的阿拉伯树胶、0.090% 的吐温-20 和 0.042% 的抗坏血酸. 效果验证和稳定性评价结果表明, 抗坏血酸对纤维素酶和脱氢酶的酶活影响较大, 此条件下保藏 30 d 后, 微生物的存活率为 63.9%, 活菌数为 1.86×10^9 CFU·mL⁻¹, 霉菌杂菌数为 1.4×10^5 CFU·mL⁻¹, 杂菌率为 0.022%, 可达到我国《农用微生物菌剂》(GB 20287—2006) 的技术指标要求. 本研究探索了食品保鲜与保藏等领域的技术手段对液态复合微生物菌剂保存效果的影响, 为提高液态菌剂的保存提供了一种新方法.

关键词 微生物菌剂, 增稠剂, 乳化液, 抗氧化剂.

中图分类号 X-1; O6 **文献标识码** A

Study on the preservation technology of liquid composite microbial inoculants

LI Chunxia^{1,2} LI Yueyue^{1,2} LI Xiufen^{1,2}**

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. Jiangsu Cooperative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Suzhou, 215009, China)

Abstract Compared with solid microbial inoculants, liquid composite microbial inoculants have the advantages of simple preparation method, easy storage, convenient transportation and short start-up time, which can quickly start the reactor and improve practical efficiency. The novel liquid composite microbial inoculants are prepared with the aid of the technical means in the fields of food preservation in this study. It would provide important references for its large-scale production and practical application. The influence of thickeners, emulsifiers and antioxidants on the preservation efficiency of microbial inoculants is investigated and the response surface optimization is conducted. The optimal conditions for preparing liquid composite microbial inoculants are 0.401% arabic gum, 0.090% Tween-20 and 0.042% ascorbic acid. The results of effectiveness verification and stability evaluation indicate that ascorbic acid has a significant impact on the enzyme activities of cellulase and dehydrogenase. After 30 days of storage under these conditions, the microorganism survival rate is 63.9%. The number of viable bacteria is 1.86×10^9 CFU·mL⁻¹, a mould count is 1.4×10^5 CFU·mL⁻¹

2023年6月26日收稿(Received: June 26, 2023).

* 重庆市生态环境局科研项目(2023-003)和国家重点研发计划课题(2016YFC0400707)资助.

Supported by Supported by the Research Project of Chongqing Bureau of Ecology and Environment (2023-003) and the National Key R&D Program of Ministry of Science and Technology of China (2016YFC0400707).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: xfli@jiangnan.edu.cn

and a mixed bacterial rate is 0.022%, It meets the technical indicator requirements of China's "Microbial inoculants in agriculture" (GB 20287-2006). This study explores the influence of technical means in the fields of food storage on preserving liquid composite microbial inoculants, and provides a novel method for the preparation of liquid microbial inoculants.

Keywords microbial inoculants, thickening agent, emulsifier, antioxidant.

复合微生物菌剂是指由两种或两种以上具有不同功能并具有共生、互生关系的微生物以适当的比例进行组合并进行混合培养所配制的微生物共生体^[1-3], 已广泛应用于农业、生活、环保等领域, 具有保护资源环境、调节生态平衡等功能, 在国内外受到广泛重视及认可. 与固态微生物菌剂相比, 液体复合微生物菌剂具有制备方法简单、易保存、运输方便、启动时间短等优点, 可达到快速启动反应器和提高处理效率的目的, 在实践中极具开发潜力和应用前景^[4]. 然而, 液态复合菌剂在保存过程中受外界条件的影响较大, 菌株细胞存在老化失活等现象^[4-5], 造成使用效果较差, 启动速度较慢等问题. 因此, 如何维持液态微生物菌剂中有效微生物的活菌数, 保存方法十分关键. 曾红等^[6]研发了一种棉花黄萎病防治菌剂, 结果表明, 添加防腐剂可以延长液体制剂贮藏期, 添加乳化剂有利于液体微生物菌剂的均匀分散, 添加紫外防护剂则可降低紫外线产生的杀伤作用. 陈令浩等^[7]向发酵液中加入 3%—5% 的纳米氧化锌制备复合微生物菌剂, 也取得了较好的保存效果. 车建美等^[8]将 0.2% 的琼脂和 2%—5% 的 NaCl 添加到具有保鲜功能的微生物短芽孢杆菌发酵液中, 制成微生物保鲜菌胶悬剂, 其活菌含量高, 质地均匀, 无上下分层, 稳定性能良好. 邓勋等^[9]制备了一种绿木霉 T43 抑菌活性成分水剂剂型, 包括 40%—60% 发酵液、0.5%—1.5% 聚三氧硅烷、0.5%—1.5% 乳化剂 OP-10、0.1%—0.3% 抗氧化剂 BHT、0.2%—0.5% 抗紫外剂 UV531 和 0.3% 苯甲酸钠, 获得的菌剂具有较长的保藏时间. 然而, 截至目前, 尚无多因素交互作用效果的研究报道.

本研究拟在课题组已有研究工作的基础上, 借鉴食品保鲜与保藏等领域的理论和技术手段, 针对影响菌剂保存效果的关键因素, 研究菌剂保存效果对关键因素的响应规律, 进一步的通过响应面优化实验研究关键因素的交互作用效果, 获得高效、稳定液态微生物菌剂的保存方法, 为其规模化生产及实际应用提供重要参考.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

受试菌株均为实验室自行保藏的芽孢杆菌 ZX5、ZX6、GX2、GX5 和 GX9, 均筛选自玉米秸秆与剩余污泥的混合堆肥物. 菌株 ZX5 为地衣芽孢杆菌, 可降解糖类和蛋白质. 菌株 ZX6 为枯草芽孢杆菌, 可降解糖类、脂肪和蛋白质. 菌株 GX2 为嗜热淀粉芽孢杆菌, 菌株 GX5 为嗜热短芽孢杆菌, 菌株 GX9 为 *thermolactis* 芽孢杆菌, 3 株菌均可降解木质纤维素, 且均为高温菌株.

种子培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹、牛肉浸膏 3 g·L⁻¹、氯化钠 5 g·L⁻¹、pH 为 7.2±0.2. 计数培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹、牛肉浸膏 3 g·L⁻¹、氯化钠 5 g·L⁻¹、琼脂 15 g·L⁻¹、pH 为 7.0—7.2.

1.2 实验方法

1.2.1 种子液活化及菌液制备

将 4 ℃ 冰箱内保藏的上述菌株接入已灭菌的液体肉汤培养基中, 放置摇床上 160 r·min⁻¹ 活化 12 h 后, 在固体肉汤培养基上三区平板划线, 置于培养箱中培养 24 h 后, 挑选三区单菌落转接两次后, 可作为发酵菌株使用.

挑取已活化的发酵菌株单菌落, 接种于装有 100 mL 已灭菌的肉汤培养基 250 mL 三角瓶中, 置于摇床振荡培养, 在温度为 35 ℃ 和 45 ℃, 转速为 160 r·min⁻¹ 摇床中培养 12 h 后, 获得相应菌株的菌液.

1.2.2 关键制备条件对液态微生物菌剂制备保藏效果的影响

将芽孢杆菌 ZX5、ZX6、GX2、GX5 和 GX9 的菌液, 以活菌数比 1:7:617:295:443 的比例混合, 向复合菌液中添加不同的添加剂, 以活菌数为评价指标, 进行最佳增稠剂种类(质量分数 0.2% 的阿拉伯树

胶、海藻酸钠和琼脂溶液)、最佳增稠剂浓度(0、0.2%、0.4%、0.6%和0.8%)、最佳乳化剂种类(体积分数为0.5%的吐温-20和吐温-80,质量分数0.5%的月桂酸单甘油酯)、最佳乳化剂浓度(0、0.1%、0.2%、0.3%和0.4%)、最佳抗氧化剂种类(质量分数为0.05%的茶多酚、抗坏血酸和二丁基羟基甲苯BHT)、最佳抗氧化剂浓度(0、0.02%、0.04%、0.06%和0.08%)的单因素优化研究.以不加添加剂的空白菌液作对比,测定0、7、14、21、28 d的活菌数,通过活菌保存率获得液态菌剂制备的最佳条件范围,用于后续响应面优化研究.制备过程中,所有药剂、离心管等均经121℃、30 min高压灭菌.每组试验3次重复,结果取平均值.

1.2.3 液态微生物菌剂制备的响应面优化

根据上述研究结果,获得增稠剂(A)、乳化剂(B)、抗氧化剂(C)较适水平,设计3因素3水平响应面优化实验,见表1.根据分析结果,最终获得液体复合微生物菌剂的最佳制备条件.

表1 设计因素编码与水平

Table 1 Design factor coding and level

因素 Factor	A增稠剂(阿拉伯树胶) A Thickener (Gum arabic)	B乳化剂(吐温-20) B Emulsifier (Tween-20)	C抗氧化剂(抗坏血酸) C Antioxidant (Ascorbic acid)
-1	0.2%	0.05%	0.02%
0	0.4%	0.1%	0.04%
1	0.6%	0.15%	0.06%

1.3 分析测试项目与方法

活菌数采用平板计数法测定^[10].纤维素酶活参照《GB 20287-2006》中3,5-二硝基水杨酸法测定^[4].脱氢酶(DHA)酶活采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑法测定^[11].总有机碳(TOC)采用重铬酸钾氧化法(NY 525-2012)测定.多糖采用苯酚硫酸法测定^[12].

1.4 数据分析方法

采用Design-Expert软件进行响应面实验设计及结果分析.Microsoft Excel 2017用于数据的统计分析.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 关键制备条件对液态微生物菌剂制备保藏效果的影响

2.1.1 增稠剂添加对液态微生物菌剂活菌数的影响

增稠剂是一种常用食品添加剂,具有分散、稳定溶液的作用,可以增加体系的黏稠度,减慢蛋白质分子的运动,降低蛋白颗粒因重力作用而沉降,延长体系稳定时间^[13].此外,增稠剂能在蛋白质粒子表面形成亲水性薄膜及保护胶体,防止凝集沉淀.本研究选取阿拉伯树胶、海藻酸钠和琼脂作为研究对象,研究增稠剂种类及浓度对液态微生物菌剂制备保藏效果的影响,结果如图1所示.

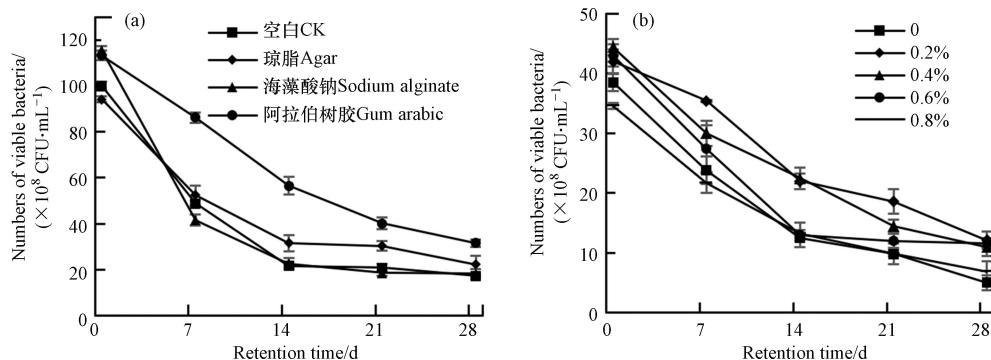


图1 增稠剂对液态菌剂保藏效果的影响

(a. 增稠剂种类; b. 增稠剂浓度)

Fig.1 Effect of thickener on preservation of liquid bacteria

(a. Thickener types; b. Thickener concentration)

由图 1a 可知, 在第 28 天时, 阿拉伯树胶的活菌数显著高于空白 45.4%。与琼脂和海藻酸钠相比, 保藏 28 d 后, 添加阿拉伯树胶的菌剂中活菌数较高, 为 29.3%。阿拉伯树胶是一种中性或弱酸性的支链复杂多糖, 其中包含的阿拉伯半乳聚糖通常用作稳定乳化剂, 阿拉伯半乳聚糖蛋白以“荆花模型”为代表, 既提供疏水性多肽链又提供亲水性碳水化合物嵌段, 赋予其良好的乳化特性^[14-15]。在此基础上, 对阿拉伯树胶的添加浓度进行筛选(图 1b), 可见, 在第 3 日之前, 阿拉伯树胶在 0.4% 浓度处的菌剂活菌数显著高于其他浓度。此外, 在第 14 天和 28 天时(第 7、21 天除外), 0.4% 与 0.2% 的阿拉伯树胶活菌数之间的差异不显著。之后随着浓度的增加, 活菌数呈降低趋势。优先考虑阿拉伯树胶在短期内活菌数高的性能, 选取 0.4% 阿拉伯树胶继续实验研究。

2.1.2 乳化剂添加对液态微生物菌剂活菌数的影响

乳化剂可以有效阻止液滴的聚结和絮凝, 从而维持体系长期稳定。本研究选取吐温-20、吐温-80 和月桂酸单甘油酯作为研究对象, 研究乳化剂的种类及浓度对液态微生物菌剂活菌数的影响, 结果如图 2 所示。

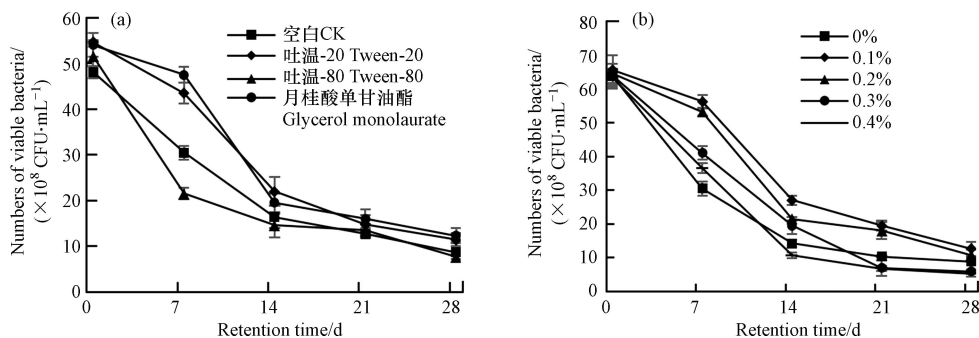


图 2 乳化剂对液态菌剂保藏效果的影响
(a. 乳化剂种类; b. 乳化剂浓度)

Fig.2 Effects of emulsifiers on the preservation of liquid bactericides
(a. Emulsifier types. b. Emulsifier concentration)

由图 2a 可知, 添加吐温-80 菌剂活菌数降低较快, 最终活菌保存率为 14.9%。吐温-20 和月桂酸单甘油酯的降低趋势相近, 月桂酸单甘油酯的活菌保存率为 23.2%, 而吐温-20 为 21.1%。月桂酸单甘油酯因其具有抑菌广谱性, 还存在水溶性差、浓度过高会形成胶束等问题^[16], 故选择吐温-20 进行后续实验。John 等^[17]也指出, 乳化剂在配方的稳定性、微生物的均匀分散和活力中起着重要作用。乳化剂浓度的研究结果表明(图 2b), 在第 7、14、21、28 天时, 0.1% 吐温-20 的活菌数显著高于其他浓度的活菌数。考虑活菌的存活率, 选取 0.1% 吐温-20 继续实验研究。

2.1.3 抗氧化剂添加对液态微生物菌剂活菌数的影响

抗氧化剂被认为是一类能通过各种途径有效清除内源和外源性自由基或抑制氧化扩散及提高机体内抗氧化酶活性和数量, 并对自由基所致病变有防治作用的物质^[18]。本研究选取茶多酚、抗坏血酸、BHT 作为研究对象, 对抗氧化剂的种类及浓度进行筛选, 结果如图 3 所示。

由图 3a 可知, 在抗氧化剂种类优化中, 保存 28 d 后, 添加抗坏血酸的菌剂活菌数最高, 菌株存活率达 36.3%; 茶多酚其次, 存活率为 21.5%; BHT 最低, 存活率为 16.8%。由此可知, 抗坏血酸的抗氧化效果最佳。抗坏血酸是通过在 L-抗坏血酸中氧化葡萄糖而得到的, 导致 4 个氢原子还原形成两个水分子^[19]。抗坏血酸作为一种极好的氧化剂, 可以被氧化, 形成相对稳定且无反应性的氧化形式(单氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸)。当它以适当的比例使用时, 可以增加主要抗氧化剂的活性^[20]。在此基础上, 进行抗坏血酸的浓度优化, 结果如图 3b 所示。可见, 随着抗坏血酸浓度的增加, 活菌保存率提高, 在第 14、21、28 天时, 0.06% 的抗坏血酸活菌保存率显著高于 0.04% (第 7 天除外), 28 天时保存率达 45.5%, 浓度继续增加, 活菌保存率降低。考虑整个保存期间活菌存活率性能, 选取 0.06% 的抗坏血酸继续实验研究。

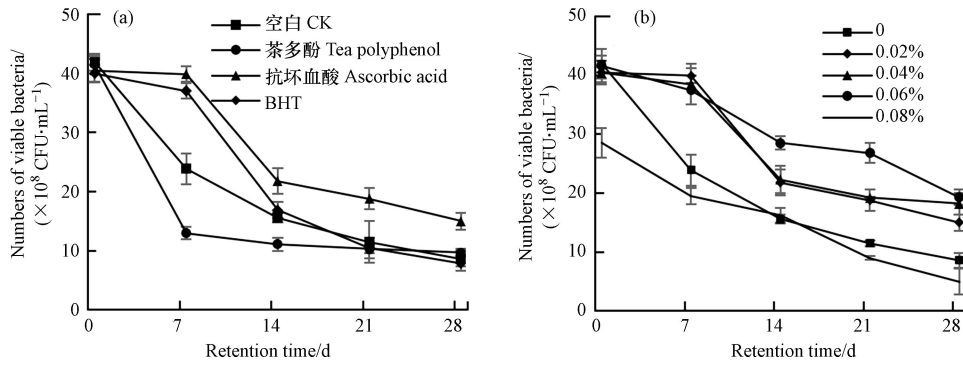


图3 抗氧化剂对液态菌剂保藏效果的影响
(a. 抗氧化剂种类; b. 抗氧化剂浓度)

Fig.3 Effects of antioxidants on the preservation of liquid bactericides
(a. Antioxidant types; b. Antioxidant concentration).

2.2 液态微生物菌剂制备的响应面优化研究

2.2.1 模型构建及检验

响应面法是一种综合试验设计和数学建模的优化方法,通过对具有代表性的局部各点进行研究,回归拟合全局范围内因素与结果间的函数关系,并且取得各因素最优水平值^[21].本研究中,在单因素实验的基础上,选取增稠剂(A)、乳化剂(B)、抗氧化剂(C)3个关键影响因素,分别选取3个水平,进行三因素三水平响应面优化研究,以活菌存活率为评价指标,研究关键影响因素对液态菌剂制备的综合效应,获得液态菌剂制备的最佳方法.因素水平设计如表1所示,实验方案设计及结果如表2所示,方差分析如表3所示.

表2 响应面优化设计及实验结果

Table 2 Response surface optimization design and experimental results

实验号 Experiment number	A	B	C	活菌存活率/% Survival rate of viable bacteria
1	0.4	0.10	0.04	60.0
2	0.6	0.10	0.06	50.9
3	0.4	0.05	0.06	51.8
4	0.4	0.15	0.06	46.4
5	0.2	0.10	0.02	51.2
6	0.4	0.10	0.04	66.0
7	0.6	0.15	0.04	48.5
8	0.6	0.05	0.04	60.7
9	0.4	0.10	0.04	61.1
10	0.4	0.05	0.02	44.8
11	0.2	0.15	0.04	59.0
12	0.4	0.10	0.04	65.4
13	0.4	0.15	0.02	44.2
14	0.4	0.10	0.04	59.2
15	0.6	0.10	0.02	39.4
16	0.2	0.05	0.04	52.2
17	0.4%	0.1%	0.04%	47.6

由表3可知,以活菌存活率为响应值时,模型 $P < 0.01$,表明二次方程模型极显著.失拟项 $P = 0.0906 > 0.05$ 不显著,说明回归方程拟合度较高,数学模型稳定,可用该数学模型对液态微生物菌剂活菌存活率进行预测.由 P 值可知,二次项 AB 和 C^2 对菌剂活菌存活率影响极显著 ($P < 0.01$),一次项

C 、二次项 AC 、 A^2 和 B^2 影响显著 ($P < 0.05$), A 、 B 和 BC 影响不显著 ($P > 0.05$). 根据 F 值, 判断各因素对活菌存活率的影响大小依次为抗坏血酸、吐温-20 和阿拉伯树胶, 说明抗坏血酸对活菌存活率的影响最显著.

表 3 回归方程的方差分析表

Table 3 Analysis of variance table for regression equation

类型 Type	SS	DF	MS	F	Pr>F	显著性 Significant
模型 Model	955.05	9	106.12	16.45	0.0006	**
A	13.78	1	13.78	2.14	0.1873	
B	16.25	1	16.25	2.52	0.1566	
C	36.55	1	36.55	5.66	0.0489	*
AB	90.25	1	90.25	13.99	0.0073	**
AC	57	1	57	8.83	0.0207	*
BC	5.76	1	5.76	0.89	0.3762	
A^2	48.17	1	48.17	7.47	0.0292	*
B^2	62.65	1	62.65	9.71	0.0169	*
C^2	574.66	1	574.66	89.06	<0.0001	**
残差	45.17	7	6.45			
失拟项	5.54	3	1.85	0.19	0.0906	不显著 Not significant
纯误差	39.63	4	9.91			

注: SS—平方和, DF—自由度, MS—均方, Pr>F—无显著影响的概率, **非常显著, *显著.

Notes: SS—Sum of squares, DF—Degree of freedom, MS—Mean square, Pr>F—Probability of no significant impact, **very significant, *significant.

对响应面实验结果进行多元线性回归和二项式拟合, 得到关于 Y 的回归方程, 如式(1)所示. 式中, A 表示阿拉伯树胶的浓度, B 表示吐温-20 的浓度, C 表示抗坏血酸的浓度.

$$Y = 62.34 - 1.31A - 1.42B + 2.14C - 4.75AB + 3.78C - 1.20BC - 3.38A^2 - 3.86B^2 - 11.68C^2 \quad (1)$$

根据 Design-Expert 软件, 分析得出残差的正态概率分布图(图 4a)、残差与预测值分布图(图 4b)和预测值与实际值分布图(图 4c). 由图 4a 可知, 残差的正态概率分布应在一条直线上, 说明模型适应性好. 图 4b 残差与预测值分布无规律. 由图 4c 可知, 残差与预测值分布图尽可能在一条直线上. 由图 4 可以看出, 利用响应面法拟合液态微生物菌剂关键因素优化的模型适应性较好.

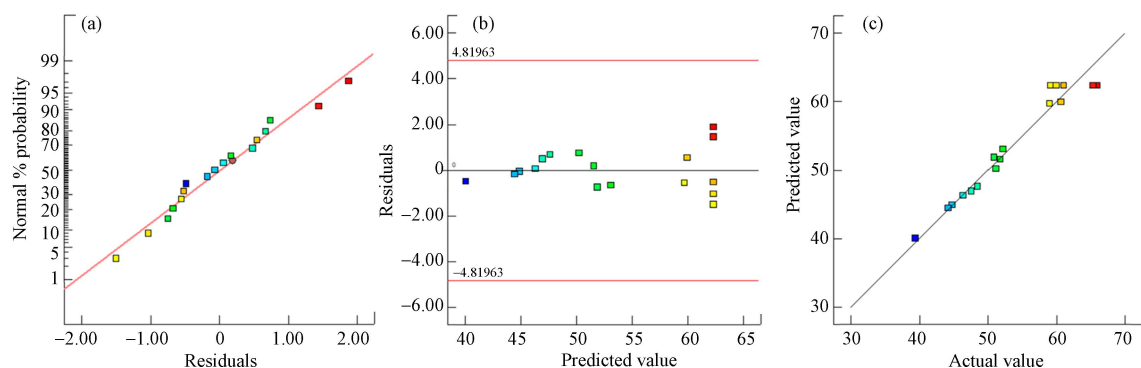


图 4 关键因素模型适应性

(a. 残差的正态概率分布图; b. 残差与预测值分布图; c. 预测值与实际值分布图)

Fig.4 Key factor model adaptability

(a. Normal probability distribution of residuals. b. Residual and predicted value distribution. c. Distribution of predicted and actual values)

2.2.2 响应曲面和等高线图

响应面法根据二次方程模型分别做出试验因素间交互作用的三维立体响应曲面和等高线图, 考察

在某个因素固定于中心值不变的情况下,其他两个因素的交互作用对液态微生物菌剂活菌存活率的影响,响应面及等高线图见图 5、6 和 7 所示. 响应面图的曲面坡度越大,则因素的改变对于响应值的影响越显著,表明两因素交互作用对响应值的影响越大. 反之,响应面图曲面越平缓,则因素对于响应值的影响不显著,两因素交互作用对响应值的影响较小. 等高线直观地反映出两个因素之间交互作用的显著程度,其中椭圆越扁平或椭圆的轴线与坐标轴之间角度越大,则表明两因素交互作用越显著,反之,则不显著.

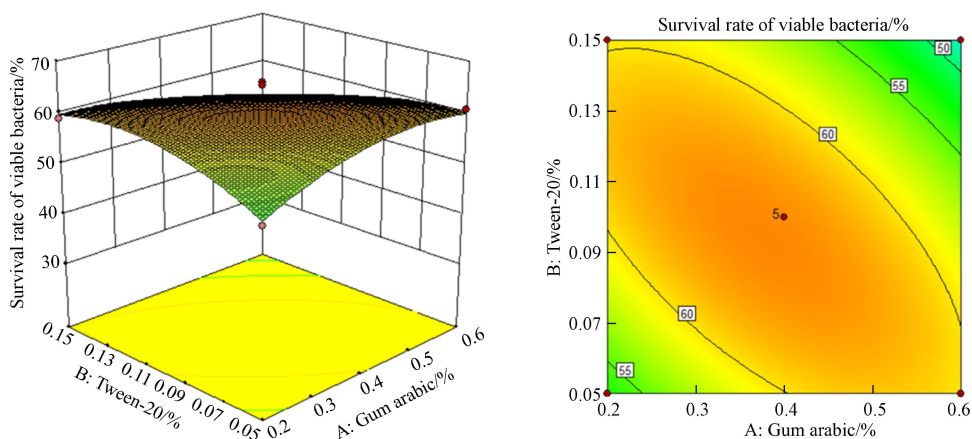


图 5 阿拉伯树胶和吐温-20 对活菌存活率的交互影响

Fig.5 Interactive effects of gum arabic and Tween-20 on viability

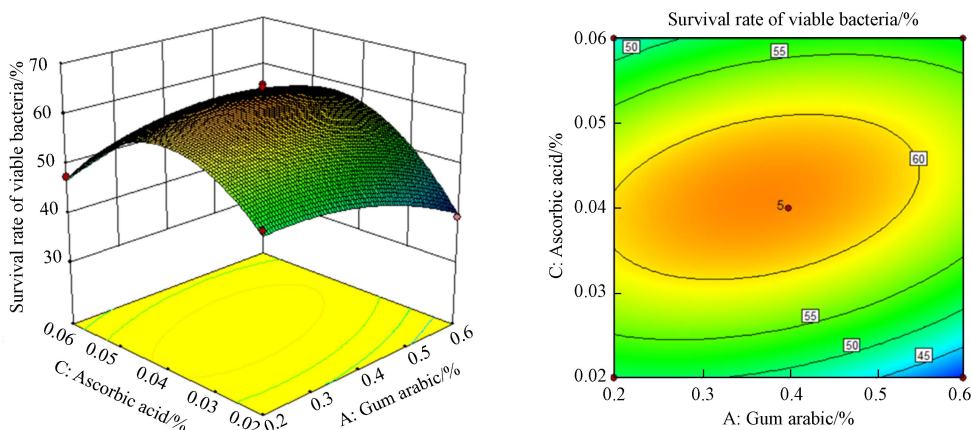


图 6 阿拉伯树胶和抗坏血酸对活菌存活率的交互影响

Fig.6 Interactive effects of gum arabic and ascorbic acid on viability

从图 5 的等高线图可见,阿拉伯树胶和吐温-20 交互作用显著. 从三维立体图可见,活菌存活率在合适的阿拉伯树胶和吐温-20 的浓度下具有最大值. 该极大值出现在阿拉伯树胶浓度 0.35%—0.45% 和吐温-20 浓度为 0.09%—0.11%. 从图 6 的等高线图可以看出,在吐温-20 不变条件下,阿拉伯树胶和抗坏血酸对活菌存活率的交互影响显著,三维立体图可看出,活菌存活率存在极大值点,该极大值点出现在阿拉伯树胶 0.35%—0.45% 和抗坏血酸 0.035%—0.045%. 从图 7 的等高线图可以看出,在阿拉伯树胶不变条件下,吐温-20 和抗坏血酸对活菌存活率的交互影响显著,三维立体图中可见,活菌存活率存在极大值点,该极大值点出现吐温-20 浓度 0.09%—0.11% 和抗坏血酸 0.035%—0.045%.

2.2.3 效果验证

响应曲面和等高线图反映了响应面图在考察因素范围内存在极值,通过 Design-Expert 软件进行验证优化,得到液态微生物菌剂制备活菌存活率最高时的工艺条件为: 0.401% 的阿拉伯树胶、0.090% 的吐温-20 和 0.042% 的抗坏血酸,预测活菌存活率达 62.592%. 通过保存期间相关指标的测定,评价菌剂的安全及稳定性,结果如表 4 所示.

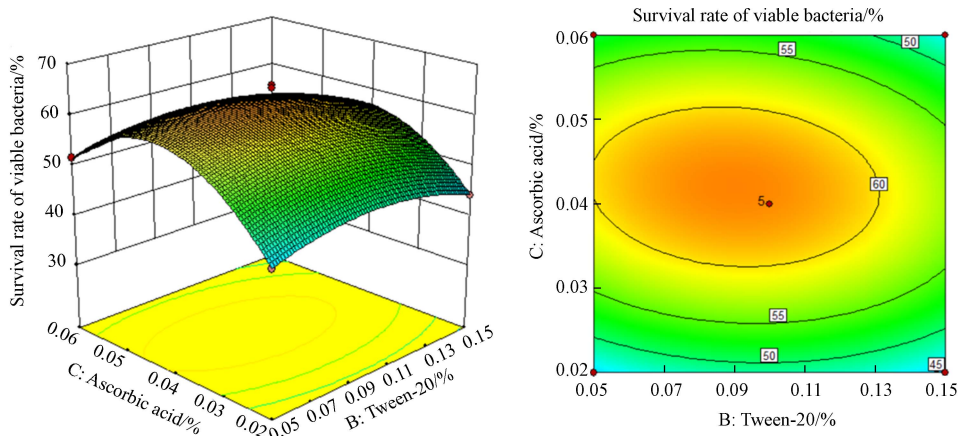


图7 吐温-20和抗坏血酸对活菌存活率的交互影响

Fig.7 Interactive effects of Tween-20 and ascorbic acid on viability

表4 不同添加剂对液态菌剂相关指标的影响

Table 4 Effects of different additives on relevant indicators of liquid bacteria

指标 Indicators	时间/d Time	CK	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
纤维素酶活/ (U·mL ⁻¹) Cellulase activity	0	1.682	1.023	0.955	2.614	1.692	2.455	2.091	2.068
	15	0.455	1.228	0.750	2.159	0.727	1.727	2.023	1.523
	30	0.091	1.406	0.568	2.796	0.409	2.887	2.319	1.773
DHA酶活/ (U·mL ⁻¹) DHA activity	0	124.47	122.06	63.20	59.77	80.06	41.20	64.06	47.78
	15	159.06	241.63	252.91	200.92	200.91	161.76	197.20	177.92
	30	36.92	24.92	18.47	17.06	34.91	26.92	23.20	37.77
TOC/ (g·L ⁻¹)	0	1.051	1.732	0.556	0.869	1.511	1.407	0.484	1.421
	15	2.809	1.809	1.374	1.703	1.676	3.201	1.718	2.506
	30	1.861	1.749	1.470	1.817	1.064	1.657	0.705	0.839
多糖/ (g·L ⁻¹) Polysaccharides	0	0.241	0.603	0.174	0.142	0.340	0.385	0.281	0.485
	15	0.184	0.980	0.199	0.192	1.461	1.246	0.211	1.073
	30	0.172	0.786	0.139	0.143	0.990	0.772	0.227	1.063
活菌数/ (×10 ⁸ CFU·mL ⁻¹) Numbers of viable bacteria	0	29.1	25.8	30.3	27.3	25.5	31.5	30.6	29.1
	15	15.5	18.8	17.9	22.2	17.0	20.6	19.2	21.0
	30	5.5	13.9	8.0	12.8	14.6	15.4	17.8	18.6

由表4可知,不同添加剂对菌剂内相关指标的影响不同.3种因素对纤维素酶活的影响依次是抗坏血酸、阿拉伯树胶和吐温-20.不加任何添加剂的空白对照的纤维素酶活持续降低,加入吐温-20的纤维素酶活也降低,而其余纤维素酶活变化较小.DHA酶活在前15天时增大,到30d后急剧减少,说明前15天由于体系内营养成分较多,细胞生命活动增大;而在30d后营养成分消耗殆尽,细胞生命活动减弱.这与有机碳及多糖成分变化类似,在前15天有机碳及多糖成分呈现增大的趋势,而到30d时成分降低.同时,含有阿拉伯树胶的有机成分较高.含有抗坏血酸的DHA酶活性较低,说明抗坏血酸可抑制微生物活性.活菌数在保存过程中呈降低趋势,在第30天时,添加3种添加剂的活菌保存率为63.9%,与响应面优化实验预测活菌存活率达62.592%相近,说明响应面分析法提供的模型较真实地拟合了实际情况,证明应用响应面法对液态菌剂制备方法进行优化,不仅科学合理,而且快速有效.

所得液态复合微生物菌剂应符合我国《农用微生物菌剂》(GB 20287—2006)的技术指标要求,表5显示了液态菌剂在保存30d后的相关菌剂技术指标.与我国《农用微生物菌剂》(GB 20287—2006)对照可以看出,保存30d后,液态菌剂的活菌数仍有 1.86×10^9 CFU·mL⁻¹,活菌数能达到上述标准的要求,霉菌杂菌数为 1.4×10^5 CFU·mL⁻¹,杂菌率为0.022%,均低于标准限值,pH为7.98,在适用范围内.

表 5 相关技术指标
Table 5 Relative technical indicators

技术指标 Technical indicators	GB 20287—2006	自制液态菌剂 Preparation of liquid microbial inoculant
有效活菌数/($\times 10^8$ CFU·mL ⁻¹)	≥ 2.0	18.6
霉菌杂菌数/(CFU·mL ⁻¹)	$\leq 3 \times 10^6$	1.4×10^5
杂菌率/%	$\leq 10\%$	0.022%
pH值	5.0—8.5	7.98
保质期/m	≥ 3	1

3 结论(Conclusions)

(1)添加阿拉伯树胶、吐温-20 和抗坏血酸均有利于液态复合微生物菌剂的保藏,其中,较佳的增稠剂为 0.4% 阿拉伯树胶,活菌保存率为 29.3%,较佳的乳化剂为 0.1% 吐温-20,活菌保存率 21.1%,较佳的抗氧化剂为 0.06% 抗坏血酸,活菌存活率为 45.5%。

(2)通过三因素三水平的响应面优化研究,得到液态复合微生物菌剂中微生物存活率的多元二次回归方程为 $Y=62.34-1.31A-1.42B+2.14C-4.75AB+3.78AC-1.20BC-3.38A^2-3.86B^2-11.68C^2$,液态复合微生物菌剂制备的最佳条件为 0.401% 的阿拉伯树胶、0.090% 的吐温-20 和 0.042% 的抗坏血酸,此条件下保藏 30 d 后,微生物的存活率为 63.9%。方差分析结果显示,各因素对微生物存活率的影响大小依次为抗坏血酸、吐温-20 和阿拉伯树胶。

(3)对不同保存周期的菌剂进行效果验证和稳定性评价,结果表明,抗坏血酸对纤维素酶活和 DHA 酶活影响较大,液态菌剂在保存过程中营养成分逐渐消耗,细胞生命活动减弱。保存 30 d 后,活菌数为 1.86×10^9 CFU·mL⁻¹,霉菌杂菌数为 1.4×10^5 CFU·mL⁻¹,杂菌率为 0.022%,可达到我国《农用微生物菌剂》(GB 20287—2006)的技术指标要求。本研究为后续开发新型的液态复合微生物菌剂的保存技术提供了理论依据。在以后的研究中,有必要对其他因素(pH、温度等)和其他类型的增稠剂、乳化剂以及抗氧化剂进行深入的探索。

参考文献 (References)

- [1] SUN Q, WU D, ZHANG Z, ZHAO Y, et al. Effect of cold-adapted microbial agent inoculation on enzyme activities during composting start-up at low temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 635-640.
- [2] CHEN D Z, ZHAO X Y, MIAO X P, et al. A solid composite microbial inoculant for the simultaneous removal of volatile organic sulfide compounds: Preparation, characterization, and its bioaugmentation of a biotrickling filter[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 342: 589-596.
- [3] LI F S, GHANIZADEH H, CUI G L, et al. Microbiome - based agents can optimize composting of agricultural wastes by modifying microbial communities[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 374: 128765.
- [4] GE M S, ZHOU H B, SHEN Y J, et al. Effect of aeration rates on enzymatic activity and bacterial community succession during cattle manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 122928.
- [5] PARADHIPTA D H V, JOO Y H, LEE H J, et al. Effects of inoculants producing antifungal and carboxylesterase activities on corn silage and its shelf life against mold contamination at feed-out phase[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 558.
- [6] 曾红, 万传星, 罗晓霞, 等. 一种棉花黄萎病防治菌剂及其制备方法: CN104255806A[P]. 2015-01-07.
ZENG H, WAN C, LUO X, et al. Fungicide for control of cotton verticillium wilt and preparing method thereof: CN104255806A[P]. 2015-01-07(in Chinese).
- [7] 陈令浩. 一种用于淤泥除臭的复合生物制剂及其制备方法和应用: CN105776793A[P]. 2016-07-20.
CHEN L. Compound biological preparation used for deodorization of sludge as well as preparation method and application thereof: CN105776793A[P]. 2016-07-20(in Chinese).
- [8] 车建美, 郑雪芳, 刘波, 等. 短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 菌剂的制备及其对枇杷保鲜效果的研究 [J]. *保鲜与加工*, 2011, 11(5): 6-9.
CHE J M, ZHENG X F, LIU B, et al. Preparation of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX agent and study on its effect on loquats

- (*Eriobotrya japonica*)[J]. *Storage & Process*, 2011, 11(5): 6-9 (in Chinese).
- [9] 邓勋, 宋小双, 尹大川, 等. 绿木霉 T43 发酵液不同菌剂剂型的制备及野外应用 [J]. *中国森林病虫*, 2014, 33(2): 8-12.
DENG X, SONG X S, YIN DC, et al. Water-based and dry powder formulation preparation of *Trichoderma virens* T43 and its field application[J]. *Forest Pest and Disease*, 2014, 33(2): 8-12 (in Chinese).
- [10] 王银环, 钱凌, 董芳华, 等. 流式细胞术和平板计数法用于地衣芽孢杆菌活菌制剂检测的比较研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(3): 352-356.
WANG Y H, QIAN L, DONG F H, et al. Comparative research on the detection of viable organism preparation of *Bacillus licheniformis* between flow cytometry and plate counting method[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2018, 35(3): 352-356 (in Chinese).
- [11] XUE D, HUANG X D. The impact of sewage sludge compost on tree peony growth and soil microbiological, and biochemical properties[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(4): 583-589.
- [12] GUO C, LI J K, LI H E, et al. Influences of stormwater concentration infiltration on soil nitrogen, phosphorus, TOC and their relations with enzyme activity in rain garden[J]. *Chemosphere*, 2019, 233: 207-215.
- [13] HE Y H, WU Z S, TU L, et al. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate[J]. *Applied Clay Science*, 2015, 109/110: 68-75.
- [14] HU B, HAN L Y, KONG H L, et al. Preparation and emulsifying properties of trace elements fortified gum Arabic[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 88: 43-49.
- [15] GLOMM W R, MOLESWORTH P P, YESILTAS B, et al. Encapsulation of salmon oil using complex coacervation: Probing the effect of gum acacia on interfacial tension, coacervation and oxidative stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 140: 108598.
- [16] ARELLANO H, NARDELLO-RATAJ V, SZUNERITS S, et al. Saturated long chain fatty acids as possible natural alternative antibacterial agents: Opportunities and challenges[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2023, 318: 102952.
- [17] JOHN R P, TYAGI R D, BRAR S K, et al. Development of emulsion from rhizobial fermented starch industry wastewater for application as *Medicago sativa* seed coat[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2010, 10(3): 248-256.
- [18] KUAI L J, LIU F, CHIOU B S, et al. Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120: 106992.
- [19] BAPTISTA R C, HORITA C N, SANT'ANA A S. Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review[J]. *Food Research International*, 2020, 127: 108762.
- [20] 李铨军, 崔胜云. 抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理 [J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 86-90.
LI X J, CUI S Y. DPPH radical scavenging mechanism of ascorbic acid[J]. *Food Science*, 2011, 32(1): 86-90 (in Chinese).
- [21] LAU H L, WONG F F W F, RAJA ABD RAHMAN R, et al. Optimization of fermentation medium components by response surface methodology (RSM) and artificial neural network hybrid with genetic algorithm (ANN-GA) for lipase production by *Burkholderia cenocepacia* ST8 using used automotive engine oil as substrate[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2023, 50: 102696.