

混合菌群发酵马尾藻作为海藻肥料的研究

王明鹏¹, 陈 蕾², 刘正一², 王学江⁴, 秦 松², 闫培生^{1,3}

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003; 3. 哈尔滨工业大学 海洋科学与技术学院, 山东 威海 264209; 4. 五洲丰农业科技有限公司, 山东 烟台 264000)

摘要: 从马尾藻原位分离发酵菌群, 采用分子生物学手段分析鉴定菌种组成, 获得发酵菌株 4 株分别为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 非脱羧勒克氏菌(*Leclerciaadecarboxylata*), 鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonasleidyi*)以及赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillusmacroides*); 控制 4 菌株接种比例进行马尾藻发酵, 监测发酵过程中菌种生物量、褐藻酸含量及褐藻寡糖含量变化规律, 结果表明, 马尾藻经发酵 36 h 生成聚合度 2-5 的褐藻寡糖, 并伴随菌种二次生长及 pH 下降等易于观察检测的参数变化; 含褐藻寡糖的发酵原液稀释 600 倍后, 能够明显促进小麦种子萌发及根生长, 与清水对照相比萌发率提高 26%, 根系长度增长 37%。本研究为微生物发酵法生产海藻肥料提供了可行案例, 证实该方法简单有效, 可操作性强, 有广阔的应用前景, 为将来实现海藻发酵肥工业化生产提供理论支持和数据支撑。

关键词: 发酵; 马尾藻; 褐藻寡糖; 促生长

中图分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)02-0117-08

DOI: 10.11759/hyxx20160428001

公元 4 世纪已有海藻用作土壤肥料的记载。海藻富含多种营养物质, 能够改善土壤并对植物生长产生有益功效, 加之获取方便, 成本低廉, 常被人们用作天然有机肥料^[1]。目前, 海藻肥料已经实现商品化, 全球范围内有众多海藻肥生产厂家。根据国际农业行业权威杂志 New AG International 对以海藻为主原料的海藻肥市场统计, 2012 年, 在欧洲市场上, 海藻肥经济价值 20 亿~40 亿欧元, 全球预计最低为 80 亿欧元, 仅占整个农资市场(含化肥、杀虫杀菌市场)总额的 2%, 海藻肥在农业上的经济价值空间巨大^[2]。

据统计, 2012 年全世界海藻产量接近 2 490 万吨, 其中有相当比例的海藻作为生长促进剂及土壤调节剂被应用于种植领域^[3]。大型海藻主要分为红藻、绿藻、褐藻三大门类, 其中褐藻是全球范围内应用最为广泛的海藻肥生产原料, 包括海带、马尾藻、泡叶藻、巨藻等^[4]。褐藻与其他藻类相比有其独特的营养成分, 比如褐藻酸、褐藻糖胶、褐藻多糖等。褐藻酸是褐藻细胞壁的主要组成成分, 含量占褐藻干质量的 20%~40%。褐藻酸由甘露糖醛酸和古罗糖醛酸单体通过 1-4 糖苷键连接组成长链大分子结构, 并且与褐藻糖胶、多酚、蛋白质等成分相互交联形成网络, 对支撑和维持细胞壁骨架结构起决定性作用^[5-6]。如何将海藻中的营养物质高效提取利用, 同时最大限

度地保障其活性在加工过程中不被破坏是海藻肥料制造领域需要突破的关键技术。然而, 褐藻细胞壁的复杂结构和坚韧特性是阻碍海藻细胞内活性物质释放的最大障碍。因此, 我们的需求就是分解褐藻酸这一关键成分的大分子结构, 进而瓦解海藻细胞壁, 促使海藻细胞中的营养物质的释放。目前, 海藻肥制备方法主要是依赖酸、碱及化学有机试剂等对海藻原料进行提取, 该方法虽然简单但是易造成藻肥活性物质的不可逆性破坏, 同时酸、碱、有机试剂成分

收稿日期: 2016-04-28; 修回日期: 2016-07-26

基金项目: 威海市科技发展研究计划重点项目(2010-3-96); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAB01B0); 中国科学院科技服务网络计划项目(KFJ-EW-STS-060); 国家自然科学基金青年基金项目(41401285); 河口与海岸学国家重点实验室开放课题项目(SKLEC-KF201412); 海洋公益性行业科研项目(201505022)

[Foundation: Science and Technology Development Project of Weihai (2010-3-96), National Key Technology R&D Program of China (2013BAB01B0), Science and Technology Service Network Initiative of Chinese Academy of Sciences (KFJ-EW-STS-060), Young Scientists Fund of National Natural Science Foundation of China (41401285), Open Foundation of State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research (SKLEC-KF201412), Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201505022)]

作者简介: 王明鹏(1988-), 男, 山东聊城人, 博士研究生, 从事海洋生物资源利用研究, 电话: 0535-6929515, E-mail: wmpdsg@126.com; 闫培生, 通信作者, E-mail: yps6@163.com; 秦松, 通信作者, E-mail: sqin@yic.ac.cn

残留在海藻肥产品中,会对农作物及土壤环境造成危害。物理法对仪器设备要求严苛,成本较高,难以实现行业推广^[7]。因此,海藻肥生产厂家需要寻找更为环保高效的生产方法。

微生物发酵是一种反应温和,简单可控,安全环保的生物反应过程。自古以来,人们已经利用微生物发酵生产出多种产品,但是利用微生物发酵海藻的研究主要集中在生产物质乙醇和抗性天然产物^[8-10],利用微生物发酵法生产海藻肥料的研究相对较少。国内相关的几例研究是选用传统发酵微生物比如酵母,乳酸菌等混合菌群对海藻原料进行类似堆肥发酵或好氧发酵处理。但其发酵过程可控性差,发酵周期长,目标产物不明确,难以满足工业化生产要求的统一,稳定,可控的标准,产品的质量难以保障^[11-13]。发酵海藻的微生物,因此,本文拟从解决上述问题入手,针对性地分离筛选特种发酵菌株,对马尾藻进行微生物发酵处理,并对其发酵过程及产物功效进行初步研究,探索微生物发酵生产海藻肥的可行性。

1 材料与方 法

1.1 样品采集与处理

马尾藻样品采自山东长岛,采集新鲜海藻装入自封袋后放入冰盒,运回实验室后置于 4℃冷柜保存。马尾藻经冲洗去除表面的沙粒、贝壳等杂质,置于 60℃烘干后,研磨成粉末,按照 1:20(W/V)与蒸馏水混合,于 121℃灭菌处理 20 min,冷却后离心获得海藻的热水浸提液(SWE 培养基),加入 2%琼脂,灭菌倒平板,制成马尾藻平板。

1.2 菌株的筛选与鉴定

新鲜海藻剪成 3~5 cm 的片段,置于无菌三角瓶中,瓶底加少量无菌 2216E 培养基,封口后三角瓶置于 30℃温箱培养,待 2~3 周后,将海藻片段表面附生的菌苔刮下,用无菌水梯度稀释后,涂布马尾藻平板。

1.2.1 菌株革兰氏染色

挑取平板上生长 24 h 的新鲜菌落,涂抹在载玻片中央的清水滴中,用酒精灯火焰将水分轻轻烤干。菌体细胞固定后,结晶紫染色 1 min,用自来水冲洗,碘液媒染 1 min,自来水冲洗,吸干水分,加 95%酒精数滴,并轻轻摇动进行脱色,20 s 后水洗,吸去水分,最后加番红染色 1 min,自来水冲洗,干燥后镜检。

1.2.2 菌株分子鉴定

挑取马尾藻平板上不同形态的单菌落,接种于 2216E 培养基中,过夜培养,取 1 mL 菌液提取基因组 DNA,用 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')通用引物扩增 16SrDNA,将 PCR 产物送至英潍捷基公司测序。各菌株的 16S rDNA 序列经对比后用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树。

1.3 菌株发酵

4 株菌株分别经 2216E 培养基培养 12~16 h,测定 600 nm 处吸光值,用无菌水分别调节 OD₆₀₀ 值至 1.0,将调好的 4 种菌悬液混合,按照 1%的接种比例将混合菌液转接至马尾藻液体培养基(SWE 培养基),30℃,200 r/m 培养。每隔 4 h 取样,测定马尾藻发酵液 OD₆₀₀ 值,pH 值和褐藻酸含量。另外,发酵结束后,取 5 个 5 mL 离心管,各管内加入 0.3 mL 马尾藻发酵液和 2.7 mL 马尾藻水提液,置于 30℃培养,分别在 0、1、3、5、7 h 各取出一管,测定管内褐藻酸含量。

1.4 褐藻酸含量检测

发酵液中褐藻酸含量检测采用分光光度法^[14]。原理为褐藻酸与 2 价以上金属离子生成的褐藻酸盐类(镁盐除外)是水不溶性的。利用褐藻酸钠与硫酸铜进行反应,生成褐藻酸铜[Cu(Alg)₂],过量的铜离子在 pH 为 8.5 的碱性条件下与二乙基二硫代氨基甲酸钠(铜试剂)作用产生黄棕色配合物,在其最大吸收波长 447 nm 条件下测定该配合物的吸光值,利用标准曲线求出与褐藻酸钠结合的铜离子量进而计算褐藻酸的含量。

1.5 褐藻寡糖的 TLC 检测

褐藻寡糖的分析检测可以用薄层层析法(TLC)对样品进行初步定性分析^[15]。采用 Silica Gel 60 F254 硅胶板,上样量为 2 μL,展开剂体系为正丁醇-甲酸-水=4:5:1(V:V:V),将硅胶板置于层析缸中使层析液将其两次展开,每次展开后室温下吹干,用硫酸-乙醇溶液作为显色剂,再次吹干后,在 110℃下显色 5 min,结果照相保存。

1.6 褐藻寡糖的质谱鉴定

取 36 h 发酵液 2 mL 加入 4 倍体积的无水乙醇,12 000 r/min 离心 15 min,去除发酵液中大分子成分。离心后上清液冻干后进行质谱鉴定^[16]。

1.7 种子萌发及生长实验

挑选大小相近、颗粒饱满的小麦种子，分别用清水、雷力 2000 (北京雷力)，马尾藻水提液，马尾藻 36 h 发酵液(含褐藻寡糖)，马尾藻 72 h 发酵液(不含海藻寡糖)浸泡小麦种子，每组处理分别稀释 200 倍、400 倍、600 倍、800 倍 4 个浓度，清水处理和雷力海藻肥为对照组。

每组处理的种子均浸于相应浓度的溶液中 12 h，浸种完毕后用蒸馏水冲洗 3 次。将种子整齐播在铺有双层滤纸的培养皿中，每个培养皿中均放置 60 粒小麦种子，每个处理 3 个平行共 180 粒种子，用纱布盖上，置于 25℃ 培养箱中培养，期间及时添加清水保持湿润，培养 48 h 后测定小麦种子萌发率。

将大小相近颗粒饱满的小麦种子用清水浸泡 12 h，播撒在发芽盒中，置于 25℃ 培养箱中培养 48 h，期间保持湿润。待小麦种子发芽后，挑选长势相近的幼苗，转移至盛有上述不同液肥处理的三角瓶中，进行水培实验。每个三角瓶中移接 3 株小麦幼苗，每组处理设 3 个平行共 9 株幼苗，置于光照培养箱(浙江托普 GTOP-310B)中培养，培养条件为 25℃ 光照 12 h，16℃ 暗处理 12 h。培养 72 h 后，对小麦植株进行形态观察并照相记录，选取 5 株幼苗，用直尺测量小麦根长。上述实验均进行 3 次重复。

1.8 数据处理

采用统计学分析软件 SPSS 19.0 对不同处理的种子萌发率和根长数据进行标准差和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 4 种菌株的鉴定结果

马尾藻表面生长的菌落经稀释涂布马尾藻平板，获得 4 种形态不同的菌株(图 1)，其中菌株 A1 和 M1 为革兰氏阳性菌，菌株 C1 和 S1 为革兰氏阴性菌。4 种菌株经 16SrDNA 测序，序列比对结果显示，M1 菌株与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)相似度最高为 99.79%，A1 菌株与赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus macroides*)相似度最高为 99.17%，S1 菌株与鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas leidy*)相似度最高为 99.06%，C1 菌株与非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)相似度最高为 99.37%。采用邻接法构建 4 株菌的系统发育树，结果显示与上述 4 种菌亲缘关系最近(图 2)。

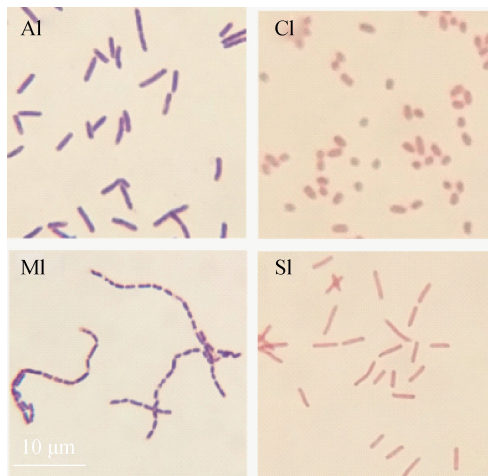


图 1 菌体形态观察及革兰氏染色

Fig. 1 Phenotypic characterization of isolated cultures

2.2 混合菌株发酵马尾藻特性

4 种菌株等比例混合接种到马尾藻水提液培养基中，菌株生长曲线与在 2216E 培养基中相比有显著区别。首先菌种生物量即最大 OD₆₀₀ 值为 2.5(图 3A)明显低于 2216E 培养基中的 4.0(图 3B)，说明马尾藻水提液培养基对发酵菌种来说较难利用，不如 2216E 培养基中的营养成分转化利用率高。其次，马尾藻水提液培养基在发酵 36 h 出现菌种二次生长现象，与此同时发酵液 pH 值出现小幅度先降后升的变化波动；而在 2216E 培养基中则无此变化。该结果说明以马尾藻为营养物质的培养基在菌株发酵至一定阶段后，会出现某种代谢产物作为新的碳源为菌种二次生长提供营养。随后检测发酵液中的褐藻酸含量变化，结果显示发酵液中的褐藻酸含量在发酵前期基本保持稳定，但在 36 h 显著下降，含量降至初始值的 40% 并保持稳定(图 3C)。由此推测菌株在发酵马尾藻过程中会分泌褐藻酸裂解酶至胞外，但该酶只偏好降解褐藻酸的其中一种组分(聚甘露糖醛酸或聚古罗糖醛酸)，故发酵结束后发酵液中仍有部分褐藻酸未被降解。为验证此推论，将 36 h 的发酵上清液与马尾藻水提液培养基混合，置于 30℃ 培养，结果显示褐藻酸含量随培养时间的延长呈逐渐下降的趋势(图 3D)，反应 7 h 后褐藻酸含量降至初始值的 40% 左右，与上述发酵结果一致；而经煮沸 15 min 后的发酵液则无法降解褐藻酸。该结果表明发酵液中确实含有褐藻酸裂解酶。

2.3 马尾藻发酵液中褐藻寡糖的检测

褐藻寡糖是褐藻酸降解后产生的低聚合度的糖

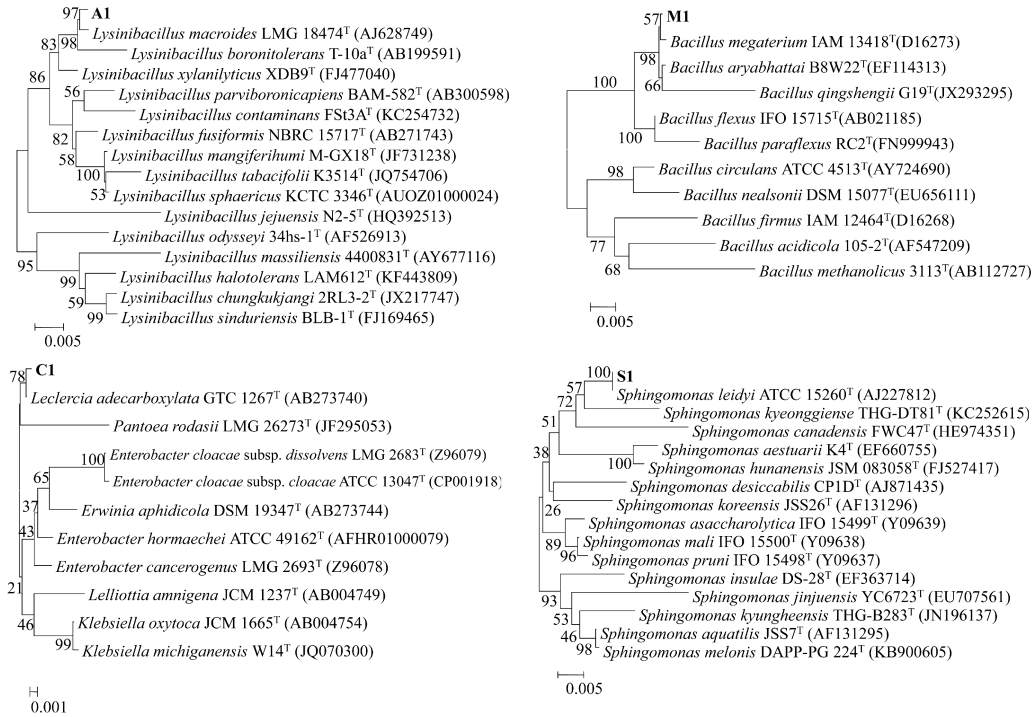


图 2 发酵菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of fermentative strain

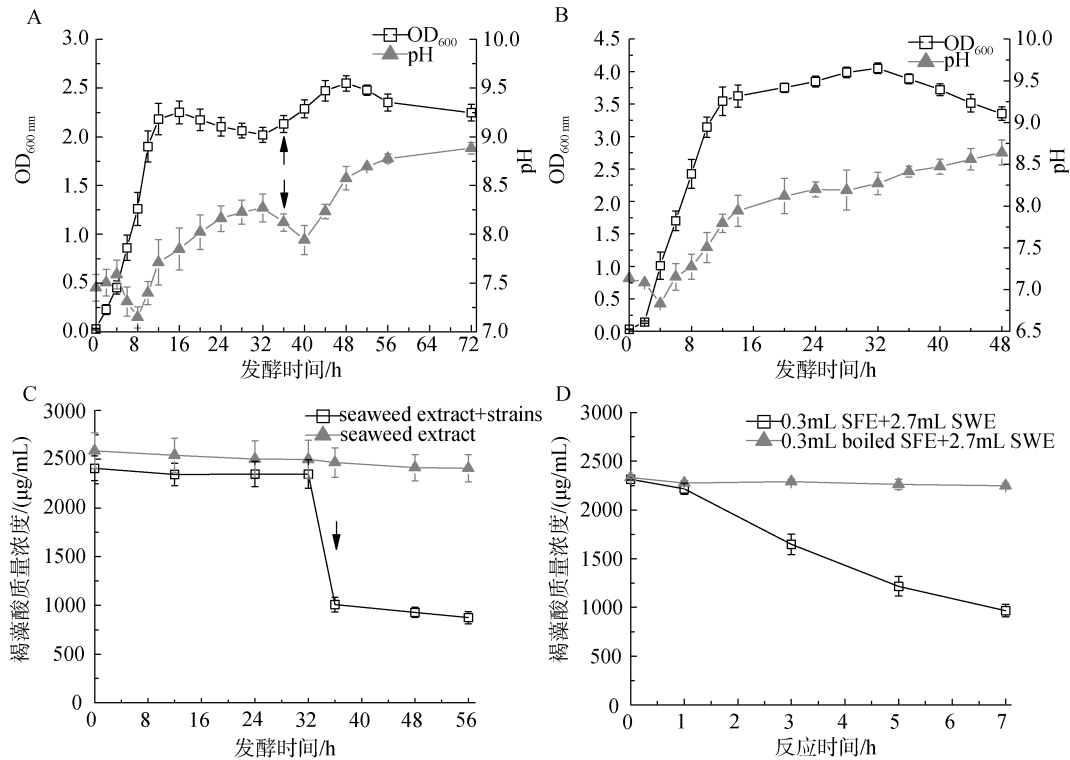


图 3 混合菌群的发酵特性

Fig. 3 Fermentation characteristics of mixed strains in different media

A. 混合菌群在马尾藻培养基中的生长曲线和 pH 变化曲线; B. 混合菌群在 2216E 培养基中的生长曲线和 pH 变化曲线; C. 马尾藻培养基褐藻酸含量变化; D. 发酵液中褐藻酸裂解酶酶活检测。SFE 为海藻发酵液, SWE 为海藻水提液
 A. The growth and pH curves of mixed strain in seaweed water extract media; B. The growth and pH curves of mixed strain in 2216E media; C. Change of alginate content in seaweed water extract media; D. Detection of alginate lyase activity of fermentation broth
 SFE stands for seaweed fermentation extract; SWE stands for seaweed water extract

链片段, 同时也是发酵液中含褐藻酸裂解酶的有力证明。因此, 我们通过薄层层析(TLC)对马尾藻发酵液进行褐藻寡糖的检测, 从而进一步验证发酵液中是否存在褐藻酸裂解酶。TLC 结果显示, 36 h 发酵液中含有褐藻寡糖, 聚合度在 2~8 之间(图 4A); 随后根据此次点样结果, 调整取样时间(自 24 h 至 48 h, 每 4 h 取一次样), 结果表明在 28~40 h 这一时段均能检测的褐藻寡糖, 但褐藻寡糖含量及种类随发酵时间的

延长呈递减趋势, 发酵 40 h 后便检测不到褐藻寡糖(图 4B)。褐藻寡糖出现的时间段与褐藻酸含量突然下降、微生物二次生长的时间段一致。由此我们推测, 在发酵 36 h 褐藻酸降解成为褐藻寡糖, 而褐藻寡糖作为碳源被菌株利用并出现二次生长现象。该结果显示发酵 32~36 h 为褐藻寡糖的最佳收获时间。随后, 36 h 的发酵液经质谱鉴定, 结果显示此发酵液中富含聚合度 2~5 的褐藻寡糖(图 4C)。

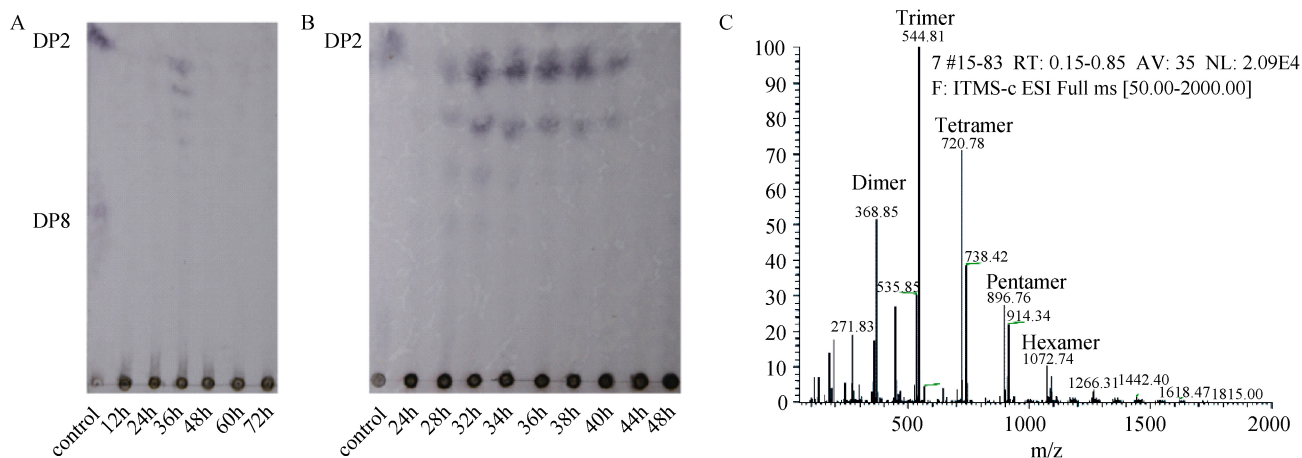


图 4 发酵液中褐藻寡糖的 TLC 和 ESI-MS 检测

Fig. 4 Detection of alginate oligosaccharides in fermentation broth by TLC and ESI-MS

A. 不同时间发酵液中褐藻寡糖的薄层层析图谱; B. 取样时间缩短后发酵液中褐藻寡糖的薄层层析图谱; C. 36 h 发酵液中褐藻寡糖质谱结果。Control 为寡糖标准品; DP2 为寡聚二糖; DP8 为寡聚八糖

A. The TLC profile of alginate oligosaccharides in fermentation broth with different fermentation time; B. The TLC profile of alginate oligosaccharides in fermentation broth with sampling intervals narrowed; C. The MS result of alginate oligosaccharides in 36 h fermentation broth. Control stands for standard alginate oligosaccharides; DP2 stands for degree of polymerization of 2; DP8 stands for degree of polymerization of 8

2.4 马尾藻发酵液的促生长效果

上述 TLC 及 ESI-MS 结果显示, 马尾藻 36 h 发酵液中含有褐藻寡糖。根据文献报道褐藻寡糖对植物有促生长及诱导抗性等有益功效^[17-23]。随后, 设计

对照及实验组, 验证褐藻寡糖的促生长功能。结果如图 5 和表 1、2 所示, 与清水对照相比, 各浓度马尾藻发酵液的促生长效果明显, 小麦萌发率显著提高, 根系长度明显增加, 并且稀释倍数越大, 其促生长



图 5 不同处理最佳浓度下的小麦根长

Fig. 5 Root length of wheat under optimum concentration of different treatments

表 1 不同发酵液处理下的小麦种子萌发率

Tab. 1 Seed germination rate of wheat under the conditions of different solutions

对照处理	稀释倍数			
	1/200	1/400	1/600	1/800
清水	74.44%±5.09 ^{ab}			
水提液	81.67%±5b ^{cd}	74.44%±8.39 ^{ab}	73.89%±9.18 ^{ab}	71.11%±8.22 ^a
36 h 发酵液	84.44%±2.54 ^{cde}	88.89%±2.54 ^{cde}	92.78%±4.19 ^e	93.33%±1.67 ^e
72 h 发酵液	85.56%±2.54 ^{cde}	87.22%±2.54 ^{cde}	90%±3.33 ^d	90.56%±4.19 ^{de}
雷力 2000	80%±3.33 ^{bc}	83.33%±3.33 ^{cd}	87.22%±3.47 ^{cde}	88.89%±2.54 ^{cde}

注: 不同字母表示处理间差异达到 5%显著水平, 下同

表 2 不同发酵液处理下小麦根长

Tab. 2 Root length of wheat under the conditions of different solutions

对照处理	稀释倍数			
	1/200	1/400	1/600	1/800
清水	6.58±0.47 ^{abc}			
水提液	7.56±0.57 ^{def}	7.02±0.49 ^{bcd}	6.78±0.53 ^{abc}	6.48±0.49 ^{ab}
36 h 发酵液	7.7±0.34 ^{efg}	8.18±0.30 ^{fg}	9±0.4 ^h	8.32±0.47 ^g
72 h 发酵液	7.16±0.48 ^{cde}	7.72±0.37 ^{efg}	8.28±0.33 ^g	7.84±0.4 ^{fg}
雷力 2000	6.2±0.46 ^a	6.28±0.49 ^a	6.74±0.4 ^{abc}	7.08±0.5 ^{bcd}

效果越明显。而海藻水提液的功效与发酵液相反, 稀释倍数越大, 其促生长效应减弱, 并且水提液的促生长效应大多逊于同浓度下的发酵液。在所有对照组和实验组中, 含褐藻寡糖的发酵液稀释 600 和 800 倍的处理对小麦的促生长效果最为显著。

3 讨论与结论

微生物发酵是利用微生物的代谢过程将底物转化成为所需的产品。因此, 微生物是发酵过程的主导者, 选用合适的发酵微生物是获取目的产物的关键。Uchida 课题组发现实验室冰箱中存放的石莼被微生物发酵释放出酯类的气味, 经分离纯化他们得到了具有较强发酵能力的一株乳酸菌和酵母菌群, 并利用该微生物对海藻乳酸型和乙醇型发酵进行初步探索^[24]。Shobharani 等则是通过目的筛选的方法, 以马尾藻提取物为唯一碳源的培养基筛选得到了能够发酵马尾藻的海洋来源的乳酸菌, 用来发酵马尾藻获取具有抗氧化功能的活性物质^[25]。上述研究都是以海藻自身为菌种来源, 筛选分离能够为己所用的“专用”菌种。这是符合自然界物种互相作用影响、共同进化规律的。因此, 海藻原位生长的菌种理论上可满足各种海藻发酵需求。本研究从降解褐藻细胞壁成分的需求出发, 针对性的筛选马尾藻原位生长的能够破坏细胞壁结构的菌群。发酵结果证明该菌群在马尾藻发酵过程中产生褐藻酸裂解酶, 能够降解

褐藻细胞壁组成成分褐藻酸, 有利于破坏海藻细胞壁结构促使胞内活性物质释放, 而单一菌种发酵马尾藻在 72 h 内均无法降解褐藻酸(数据未显示)。这一结果表明, 混合菌群在降解褐藻酸方面比单一菌种更有优势, 或许存在协作共生关系, 其具体作用机制有待进一步的深入研究。

同时, 褐藻酸降解产物褐藻寡糖也是一种功能成分, 能够诱导植物产生多种反应。近年来, 褐藻寡糖的功能成为研究热点, 结果表明褐藻寡糖有明显的促生长功能及免疫诱抗功能^[26, 27]。本研究在马尾藻发酵液中检测到褐藻寡糖成分, 这是首次报道以海藻提取液为发酵底物获得褐藻寡糖。褐藻寡糖成分可被微生物作为碳源利用, 因此需要控制发酵过程及时间, 最大限度的收获褐藻寡糖。多次发酵实验结果表明, 通过控制发酵菌株的接种比例(4 菌株等比例混合), 发酵 32~36 h 可获得稳定的发酵产物, 即聚合度为 2-5 的褐藻寡糖, 并且褐藻寡糖生成伴随明显的 pH 波动, 菌体二次生长等现象。将来在海藻工业化生产中, 通过监测发酵过程 pH 变化即可反映发酵产物的生成状况。

海藻发酵液的促生长功能通过小麦种子萌发及根长实验得到了初步验证。结果表明马尾藻发酵液的要比未发酵的水提液促生长效果明显, 而含褐藻寡糖的发酵液要比不含褐藻寡糖的发酵液效果好, 这说明微生物发酵过程确实将海藻肥中的营养成分

“升级换代,”更有利于植物吸收利用。同时,该结果再次证明褐藻寡糖的促进植物生长功效显著,是海藻发酵液中至关重要的功能成分。另外,马尾藻发酵液对根的促生长效果存在浓度剂量效应,结果显示马尾藻发酵液稀释至 600~800 倍对小麦促根生长效果最为显著,与 Anisimov 等^[28]的研究结果相符。本次使用的阳性对照为商品化的雷力海藻肥,但其促生长效果不太理想,可能是因为雷力海藻肥为高度浓缩产品,若稀释倍数太低,其促生长效应大打折扣甚至会抑制作物生长。

本研究通过原位筛选马尾藻附生菌群,获得了 4 株发酵马尾藻的菌株,控制 4 菌株接种比例可以获得稳定的发酵产物,发酵 36 h 生成聚合度 2-5 的褐藻寡糖,并伴随菌株二次生长及 pH 下降等易于观察监测的参数变化,这对海藻发酵工业化生产具有指导意义。发酵原液稀释 600 倍后,能够明显促进小麦种子萌发及根生长,萌发率提高 26%,根系长度增长 37%,具有商业化产品开发潜力和价值。

参考文献:

[1] 李书琴,王孝举,范晓. 海藻液体肥的研究[J]. 海洋科学, 1995, 3(4): 4-6.
Li Shuqin, Wang Xiaojun, Fan Xiao. Study on the seaweed liquid manure [J]. Marine Sciences, 1995, 3(4): 4-6.

[2] 杨芳,戴津权,梁春婵,等. 农用海藻及海藻肥发展现状[J]. 福建农业科技, 2014, 3: 72-76.
Yang Fang, Dai Jinqun, Liang Chunchan, et al. Current developing situation of agricultural seaweed and seaweed fertilizer [J]. Fujian Agricultural Technology, 2014, 3: 72-76.

[3] FAO. Yearbook of fishery and aquaculture statistics [C]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2012.

[4] Craigie J S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture[J]. J Appl Phycol, 2011, 23: 371-393.

[5] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
Ji Minghou. Seaweed chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1997.

[6] Michel G, Tonon T, Scornet D, et al. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes[J]. New Phytol, 2010, 188: 82-97.

[7] 王明鹏,陈蕾,刘正一,等. 海藻生物肥研究进展及展望[J]. 生物技术进展, 2015, 5(4): 158-163.
Wang Mingpeng, Chen Lei, Liu Zhengyi, et al. Progress and prospect of seaweed fertilizer[J]. Current Biotech-

nology, 2015, 5(4): 158-163.

[8] Adams J M, Gallagher J A, Donnison I S. Fermentation study on *Saccharinalatissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments[J]. J Appl Phycol, 2008, 21: 569-574.

[9] Jang J S, Cho Y, Jeong G T, Kim S K. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharinajaponica*[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2012, 35: 11-18.

[10] Lee S M, Lee J H. The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for *Laminariajaponica* utilization[J]. Bioprocess Technol, 2011, 102: 5962-5967.

[11] 张树清,刘培京. 一种复合微生物海藻有机液态肥及其制备方法[P]. 2012-02-08, CN102344315A.
Zhang Shuqing, Liu Peijing. A method of preparation of seaweed organic liquid fertilizer with composite microorganism[P]. 2012-02-08, CN102344315A.

[12] 袁亮,赵秉强,李燕婷,等. 一种发酵海藻液肥料增效剂及其生产方法与用途[P]. 2012-10-03, CN102701866A.
Yuan Liang, Zhao Bingqiang, Li Yanting, et al. A method of producing seaweed fermentation fertilizer and its application[P]. 2012-10-03, CN102701866A.

[13] 单俊伟,张俊杰,赵志强,等. 微生物发酵法处理浒苔生产海藻肥的方法[P]. 2009-07-22, CN101486612.
Shan Junwei, Zhang Junjie, Zhao Zhiqiang, et al. A method of microbial fermentation treatment of *Enteromorpha prolifera* for seaweed fertilizer production[P]. 2009-07-22, CN101486612.

[14] 王泽文,冷凯良,邢丽红,等. 褐藻酸钠的分光光度法测试技术[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 149-152.
Wang Zewen, Leng Kailiang, Xing Lihong, et al. The research on the determination of sodium alginate with spectrophotometer[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 149-152.

[15] 聂莹,张文靖,石波,等. 褐藻寡糖检测方法的建立[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(8): 29-33.
Nie Ying, Zhang Wenjing, Shi Bo, et al. Establishment of detection methods for alginate oligosaccharides[J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(8): 29-33.

[16] Liu H, Zhang Y H, Yin H, et al. Alginate oligosaccharides enhanced *Triticum aestivum* L. tolerance to drought stress[J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 62: 33-40.

[17] Hien N Q, Nagasawa N, Tham L X, et al. Growth promotion of plants with depolymerized alginates by irradiation[J]. Radiat Phys Chem, 2000, 59: 97-101.

[18] Iwasaki K, Matsubara Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward lettuce[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64: 1067-1070.

[19] Natsume M, Kamo Y, Hirayama M, et al. Isolation and

- characterization of alginate-derived oligosaccharides with root growth-promoting activities[J]. *Carbohydr Res*, 1994, 258: 187-197.
- [20] Hu X K, Jiang X L, Hwang H M, et al. Promotive effects of alginate-derived oligosaccharide on maize seed germination[J]. *J Appl Phycol*, 2004, 16: 73-76.
- [21] Tang J C, Zhou Q X, Chu H R, et al. Characterization of alginase and elicitor-active oligosaccharides from *Gracilibacillus A7* in alleviating salt stress for *Brassica campestris* L[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 7896-7901.
- [22] Ma L J, Li X M, Bu N, et al. An alginate-derived oligosaccharide enhanced wheat tolerance to cadmium stress[J]. *Plant Growth Regul*, 2010, 62: 71-76.
- [23] Zhang Y H, Zhang G, Liu L Y, et al. The role of calcium in regulating alginate-derived oligosaccharides in nitrogen metabolism of *Brassica campestris* L. var. utilis Tsen et Lee[J]. *Plant Growth Regul*, 2011, 64: 193-202.
- [24] Uchida M, Murata M. Isolation of a lactic acid bacterium and yeast consortium from a fermented material of *Ulva* spp. (Chlorophyta)[J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 97: 1297-1310.
- [25] Shobharani P, Halami P M, Sachindra N M. Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum* sp for enhanced anticoagulant and antioxidant properties[J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 114: 96-107.
- [26] Zhang Y, Liu H, Yin H, et al. Nitric oxide mediates alginate oligosaccharides-induced root development in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 71: 49-56.
- [27] Zhang Y, Yin H, Zhao X, et al. The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in *Oryza sativa* L. mediated by auxin signaling[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 113: 446-454.
- [28] Anisimov M M, Chaikina E L, Klykov A G, et al. Effect of seaweeds extracts on the growth of seedling roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) is depended on the season of algae collection[J]. *Agriculture Science Developments*, 2013, 2(8): 67-75.

Studies on fermentation of *Sargassum* by mixed microorganism utilized as seaweed fertilizer

WANG Ming-peng¹, CHEN Lei², LIU Zheng-yi², WANG Xue-jiang⁴, QIN Song², YAN Pei-sheng^{1, 3}

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3. School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China; 4. Worldfull Agricultural Science and Technology Co., Ltd, Yantai 264000, China)

Received: Apr. 28, 2016

Key words: fermentation; *Sargassum*; alginate oligosaccharide; growth promotion

Abstract: Fermentative microorganisms present on the surface of seaweed were screened and then identified by 16S rDNA sequence analysis. We obtained the following four fermentative strains: *Bacillus megaterium*, *Leclercia adecarboxylata*, *Lysinibacillus macroides*, and *Sphingomonas leidyi*. Using controlled inoculation proportion of these four strains, we obtained a stable fermentation product. We studied the changes and mechanisms of seaweed fermentation process to provide theoretical and data support for industrialization production of seaweed fermentation fertilizer. At 36 h in the fermentation process, alginate oligosaccharides with polymerization degrees of 2–5 were generated and accompanied by secondary growth of fermentative strains and a decreased pH, which were the parameters that could be easily observed and monitored. Fermentation broth diluted 600 times could significantly promote the germination and root growth of wheat seeds. Germination rate was 26% higher and root growth was 37% longer than those in the control group, respectively. These results provided a feasible strategy for the production of seaweed fertilizer by microbial fermentation. This simple and effective fermentation method has strong operability and broad application prospects.

(本文编辑: 康亦兼)