

酸碱条件对枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物产生的影响

陈 峥¹⁾ 刘 波¹⁾ 张连宝^{1,2)}

潘志针¹⁾ 黄盛芳¹⁾ 刘国红¹⁾ 朱育菁¹⁾

(1 福建省农业科学院农业生物资源研究所 福建福州 350003;

2 厦门大学生命科学学院 福建厦门 361005)

摘 要 为考察酸碱条件对枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物产生的影响, 采用气相色谱-质谱联用分析枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 菌株的胞内成分。结果表明: 通过谱库扫描得到 32 种高匹配率代谢物的初步鉴定结果, 主要包括氨基酸类、酸类、烷烃类等, 其中含量相对较高的有 7 种; 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物的种类和含量与其培养环境的酸碱度变化呈一定的相关性, 强酸性 (pH = 3) 条件下培养的胞内代谢物具有特异性, 而接近中性 (pH = 5、7) 条件及碱性 (pH = 9、11) 条件下培养胞内代谢物则相似。由此推断, 不同 pH 条件影响发酵终点的 pH, 进而影响枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物的产生。

关键词 气相色谱质谱联用 ; 枯草芽胞杆菌 ; pH ; 代谢物

分类号 S646

Effects of Initial pH Value for the Fermentation of *Bacillus subtilis* FJAT-14254 on the Generation of Metabolites Substances

CHEN Zheng¹⁾ LIU Bo¹⁾ ZHANG Lianbao^{1,2)}

PAN Zhizhen¹⁾ HUANG Shengfang¹⁾ LIU Guohong¹⁾ ZHU Yujing¹⁾

(1 Institute of Agrobiological Resources, FAAS, Fuzhou, Fujian 350003;

2 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract To study the relationship between pH of culture medium and intracellular metabolic of *Bacillus subtilis* FJAT-14254. Intracellular metabolites of *B. subtilis* FJAT-14254 were analyzed by GC-MS. 564 metabolites were detected. 31 metabolic markers including hexadecanoic acid, was obtained by data mining. The biochemical substances of *B. subtilis* FJAT-14254, produce in different pH conditions, had high specificity. The change of metabolites in different pH conditions was complex, not only linear relation. This research provided preliminary study of stress resistance of *B. subtilis* in metabolic level.

Keywords GC-MS ; *Bacillus subtilis* ; pH ; metabolites

枯草芽胞杆菌是革兰氏阳性菌, 在营养匮乏环境下, 能产生具有强抗逆性的芽胞^[1]。枯草芽胞杆菌在工业、农业生产中具有重要的应用。在工业中, 枯草芽胞杆菌作为饲料添加剂得到一定程度的应用^[2]。在农业中, 枯草芽胞杆菌能分泌特异的杀

虫蛋白, 对防治农业病虫害具有积极的意义^[3]; 某些芽胞杆菌胞外代谢物还具有抑制很多植物病原微生物生长的能力, 增强植物的免疫能力^[4], 促进植物增产等。而这些应用与枯草芽胞杆菌的抗逆能力有关。芽孢作为休眠体对各种逆境具有很强的抵抗能力,

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费(No.201303094); 福建省农科院青年创新基金(No.2013dqd-6); 福建省农科院杰出青年人才基金(No.2014JQ-2)。

收稿日期: 2015-02-02; 责任编辑/黄东杰; 编辑部 E-mail: rdnk@163.com。

陈 峥, 男, 博士, 助理研究员; 主要研究方向为微生物代谢物及功能成分研究。

通讯作者: 刘 波, 研究员; 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物; E-mail: fzliubo@163.com。

如具有耐高温、耐挤压、耐氧化、耐酸碱等特点^[5],对枯草芽胞杆菌渡过恶劣环境具有重要意义。

枯草芽胞杆菌能产生多种功能物质,如表面活性素^[6]、芬芥素(fengycin)^[7]、抗生素^[8]等。表面活性素具有潜在的工业应用价值,如提高石油开采率、植物病害控制等。抗生素在人类防止各种动植物真菌性病原菌中发挥重要作用,如芬芥素类抗生素对多种植物病原真菌具有较强的拮抗作用。

pH条件对枯草芽胞杆菌的应用具有很大的影响。林宝英等^[9]对枯草芽胞杆菌 B25 的抗菌物质在酸性、中性及微碱性条件下相对稳定,而在强碱性条件下不稳定。孔建等^[10]的研究结果表明,培养液的初始 pH 值直接影响枯草芽胞杆菌 B-903 菌株的生长繁殖和抗菌物质的产生与积累。蔡全信等^[11]研究不同液体培养基起始 pH 值对球形芽胞杆菌 C3-41 的毒力影响,证明了 pH 7 下培养的发酵液毒力最强。因此,不同 pH 条件影响了枯草芽胞杆菌代谢物的产生和含量。

本研究选用气相色谱-质谱联用(GC-MS)对枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 菌株胞内物质进行初步鉴定,通过比较不同初始 pH 的芽胞杆菌发酵液中的代谢物差异,探讨酸碱条件对该菌发酵液代谢物产生的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:枯草芽胞杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* FJAT-14254),由福建省农业科学院农业生物资源研究所提供。菌株种子培养基:胰酶大豆肉汤(TSB)培养基。菌株发酵培养基:TSB 培养基。实验试剂:TSB 培养基(美国 BD 公司),BSTFA(美国 SUPELCO 公司),氯仿(AR,衡阳市凯信化工试剂有限公司),甲醇(AR,衡阳市凯信化工试剂有限公司),去离子水。实验仪器:Agilent7890/5975C 气相色谱/质谱联用仪(美国安捷伦公司);JY92-2D 超声波细胞粉碎机;METTLER TOLEDO 电子天平 AL104(梅特勒·托利多仪器有限公司);智城恒温培养振荡器 ZH-WY-2102C(上海智城分析仪器有限公司);Sartorius pH 计 PB-10(德国赛托利斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 发酵液的制备

用 TSB 培养基平板将枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 菌株划线活化并培养 24 h。取活化的菌株接入 20 mL TSB 种子培养基中,以 30℃、170 r/min 振荡培养 12 h,成为种子液。取该种子液以 1%接种量接入预先装入 50 mL 的 TSB 液体培养基中,液体培养基设置不同的酸碱梯度, pH = 3、5、7、9、11。继续以 30℃、170 r/min 振荡培养 48 h,成为枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 发酵液。用 pH 计测定发酵后发酵液的 pH 值。

1.2.2 样品制备

取不同初始 pH 的枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 发酵液置于 10 mL 离心管中,6000 r/min 离心 10 min,倒掉上清得菌体沉淀;向离心管中加入 2 mL、4℃预冷的去离子水和等体积的 -20℃预冷的甲醇液,用漩涡震荡仪重新悬浮菌体;然后用超声波细胞粉碎机进行菌体细胞粉碎,向破碎后的菌液中加入 2 mL、-20℃预冷的氯仿液,充分震荡混匀;在 6000 r/min 条件下离心 10 min,取上层甲醇水相 2 mL 及下层氯仿相 1 mL 至新的 10 mL 离心管中,4℃保存;取甲醇水相 400 μL、氯仿相 200 μL 至 EP 管中,用氮吹仪温和的吹干;向装有样品的 EP 管中加入甲酰胺吡啶 80 μL,37℃反应 90 min;之后加入 80 μL 的 BSTFA,混匀,70℃反应 60 min;最后置于 4℃冰箱中保存,等待进样。

1.2.3 色谱条件

采用 HP5-MS 色谱柱,进样口温度为 250℃,压力为 4.534 kPa,总流量为 54 mL/min,隔垫吹扫流量为 3 mL/min,不分流进样。升温程序为:70℃保持 2 min,以 10℃/min 上升到 140℃,保持 2 min;以 4℃/min 上升到 240℃,保持 2 min;以 10℃/min 上升到 280℃,保持 8 min。

1.2.4 质谱条件

采集模式:全扫描、EMV 模式、相对值。全扫描参数:开始时的质量数为 50.0 amu,结束时的质量数为 550.00 amu;MS 温度:离子源为 230℃,MS 四级杆为 150℃。

2 结果与分析

2.1 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 在发酵前后发酵

液 pH 的变化

研究表明, 初始 pH 对枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 发酵终点 pH 的影响包括 3 种类型, 类型 : 发酵初始 pH 为酸性, 而发酵终点仍保持为酸性, 如初始 pH 为 3.00 和 5.00, 其终点 pH 为 3.25 和 6.43, 保持为酸性; 类型 : 发酵初始 pH 为中性, 而发酵终点为弱碱性, 如初始 pH 为 7.00, 终点 pH 变为 7.51, 呈弱碱性; 类型 : 发酵初始 pH 为碱性, 而发酵终点保持为碱性, 如初始 pH 为 9.00 和 11.00, 终点 pH 为 7.83 和 8.21, 保持为碱性。

2.2 不同初始 pH 条件下枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 高匹配胞内代谢物的分析

不同初始 pH 条件下枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 高匹配代谢物(匹配度在 80 以下的代谢物不做报道)的情况见表 1。在 32 种高匹配代谢物中, 包含烷烃类 16 种, 氨基酸 5 种, 酸类 6 种, 其他成分 5 种。

2.3 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 高含量胞内代谢物在不同初始 pH 条件下的变化规律

由表 1 可知, 将相对含量高于 1% 的成分定义为高含量代谢物。枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 高含量胞内代谢物在不同初始 pH 条件下的变化规律见图 1-A~1-G。高含量胞内代谢物的变化规律依据波动形态可分为 3 种类型, (1)前峰型, 是指在培养基初始 pH3~11 的变化过程中, 此类代谢物含量最高峰大体居前, 在酸性 (pH=3、5)较强的条件下达到峰值; 这类代谢物包括 L-酪氨酸、棕榈酸、L-赖氨酸、硬脂酸。(2)中峰型, 代谢物最高峰的位置大体居中, 在中性 (pH=7)条件下时此类代谢物达到最高值, 低谷与高峰之间有一个适当的过度。这类代谢物包括十四酸、2-吡咯

烷酮羧酸。(3)后峰型, 代谢物最高峰的位置大体居后, 在碱性 (pH=9、11)较强的条件下达到峰值。这类代谢物包括二十七烷烃。

以上各种代谢物在不同 pH 条件下, 其含量呈现一定的变化, 甚至消失。由此推断不同 pH 条件影响发酵终点的 pH, 进而影响枯草芽胞杆菌

表 1 不同初始 pH 条件下枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 高匹配代谢物含量

序号	代谢物	不同初始 pH 值高匹配代谢物含量				
		3	5	7	9	11
1	L-色氨酸 L-tryptophan	0.004	0	0	0	0
2	L-丙氨酸 L-alanine	0.001	0.162	0.078	0	0.009
3	L-异亮氨酸 L-isoleucine	0.001	0.073	0	0	0
4	L-酪氨酸 L-tyrosine	1.008	0	0.035	0	0.004
5	L-赖氨酸 L-lysine	0	1.674	0	0.007	0.002
6	丁烷 butane	0.019	0	0	0	0
7	十二烷 dodecane	0	0.003	0	0	0.089
8	十三烷 tridecane	0.001	0	0	0	0
9	正十四烷 n-tetradecane	0	0	0	0.011	0.004
10	十五烷 pentadecane	0	0.003	0	0.003	0
11	十六烷 hexadecane	0.446	0	0.009	0.006	0.001
12	十七烷 heptadecane	0.003	0.006	0	0.606	0.178
13	十八烷 octadecane	0	0.021	0	0.012	0
14	十九烷 nonadecane	0	0.006	0	0	0
15	二十烷 eicosane	0.013	0	0	0	0
16	二十一烷 heneicosane	0	0.002	0	0	0.001
17	二十二烷 docosane	0	0	0	0.006	0
18	二十四烷 tetracosane	0	0	0	0	0.004
19	二十五烷 pentacosane	0.007	0	0.006	0	0.048
20	二十七烷 heptacosane	0	0	0.002	0	1.138
21	二十八烷 octacosane	0	0.001	0	0	0
22	硬脂酸 (十八烷酸) stearic acid	0.002	2.162	1.827	0.011	0.011
23	棕榈酸 (十六烷酸) palmitic acid	0.001	1.061	0	0.001	0.014
24	亚硫酸 Sulphurous acid	0	0	0	0	0.001
25	2-吡咯烷酮羧酸 2-pyrrolidone carboxylic acid	0	0	1.027	0	0
26	琥珀酸 (丁二酸) succinic acid	0	0	0.233	0	0
27	十四酸 tetradecanoic acid	0	0	1.505	0	0
28	单硬脂酸甘油酯 glycerin monostearate	0	0	0.315	0.001	0.009
29	尿素 urea	0	0.220	0	0	0
30	肌醇(纤维糖、纤维醇) inositol	0	0.154	0	0	0
31	萘 naphthaline	0	0	0.008	0.002	0.031
32	乙胺 ethylamine	0	0	0	0.004	0

FJAT-14254 代谢物的产生。

2.4 不同初始 pH 条件对代谢物产生的影响及不

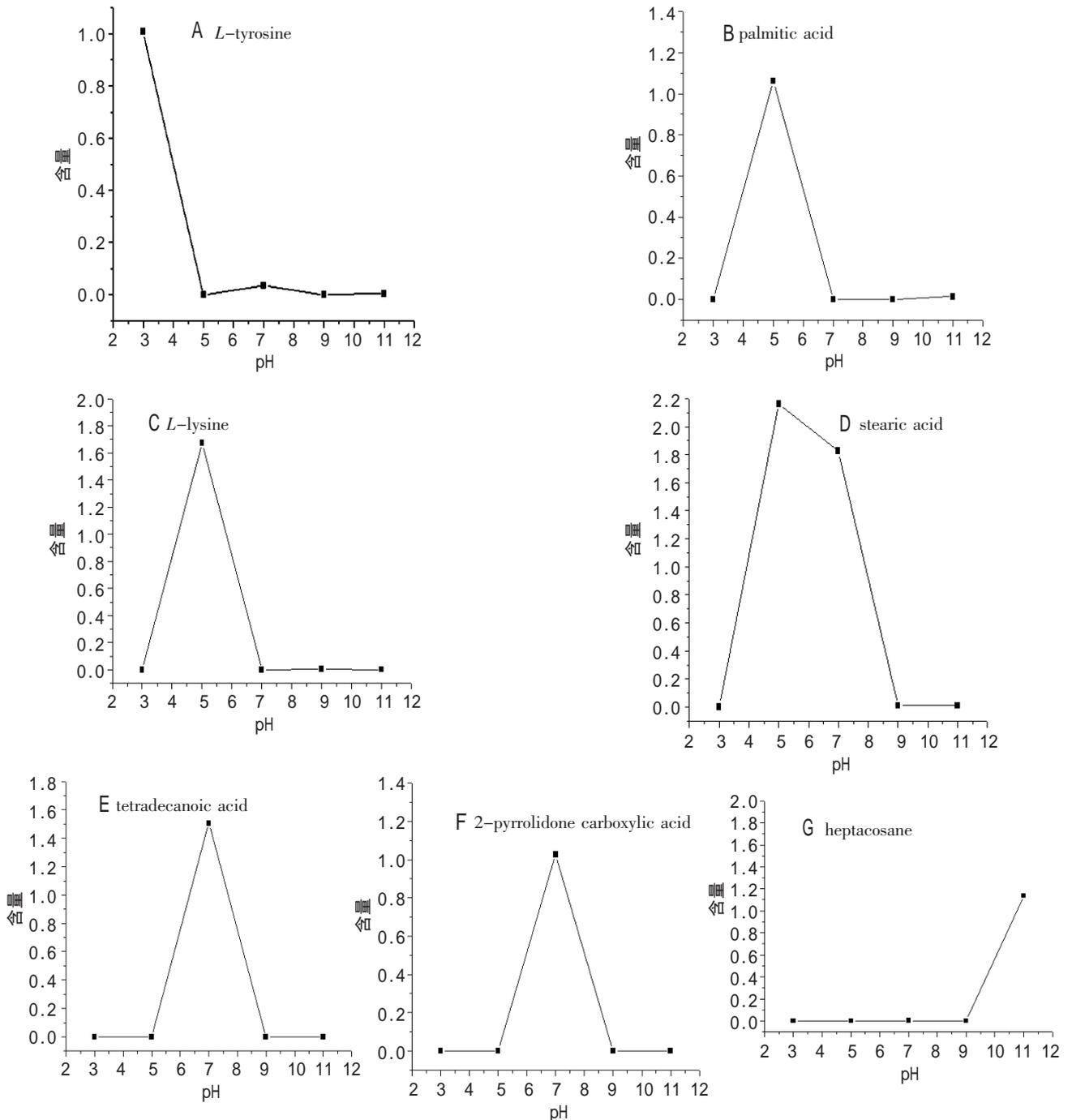


图 1 *L*-酪氨酸(A)、棕榈酸(B)、*L*-赖氨酸(C)、硬脂酸(D)、十四酸(E)、2-吡咯烷酮羧酸(F)、二十七烷(G)在不同初始 pH 条件下的含量变化

同代谢物产生的特性

2.4.1 FJAT-14254 发酵液产生代谢物的聚类分析

对不同初始 pH 条件下的胞内代谢物进行聚类分析, 结果见图 2。当相关系数为 25 时, 可将不同初始 pH 下的胞内代谢物分为 3 大类群。类群

主要为酸类和氨基酸, 包括棕榈酸、硬脂酸、琥珀酸、十四烷酸、2-吡咯烷酮羧酸、*L*-赖氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-异亮氨酸、尿素、肌醇、十九烷、二十八烷、二十一烷、十五烷、单硬脂酸甘油酯; 类群 主要为烷烃类, 包括二十四烷、二十七烷、十

二烷、二十五烷、二十二烷、乙胺、正十四烷、十七烷、萘、亚硫酸；类群 主要为烷烃类和氨基

酸，包括丁烷、十三烷、十六烷、二十烷、L-色氨酸、L-酪氨酸。

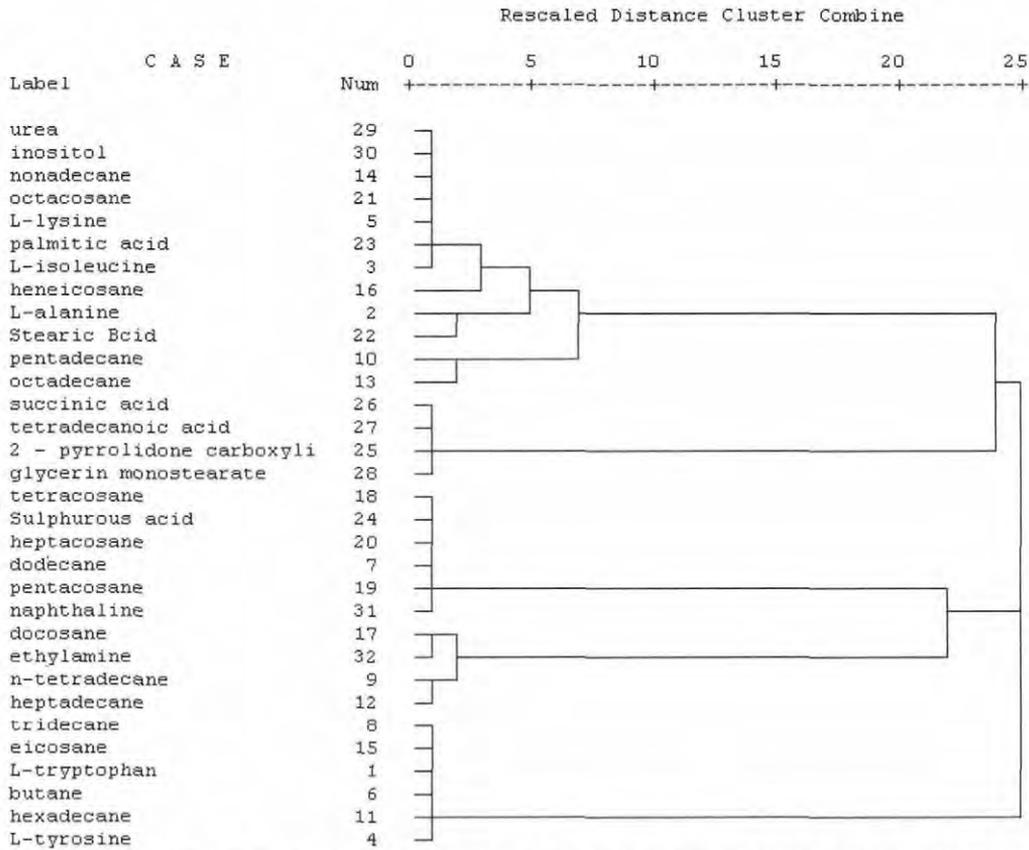


图 2 不同初始 pH 条件下枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 发酵液产生代谢物的聚类分析

2.4.2 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 不同代谢物产生的初始 pH 条件的聚类分析

对不同初始 pH 条件下的胞内代谢物进行聚类分析，结果见图 3。当相关系数为 25 时，可将不同初始 pH 下的胞内代谢物分为 3 大类群。类群包括初始 pH 为 3 的代谢物，其特点为：发酵终点 pH 为 3.25，呈较强酸性，且含有 L-色氨酸、丁烷、十三烷、二十烷，而其他类群中没有。类群包括初始 pH 为 5、7 的代谢物，其特点为：发酵终点 pH 值为 6.45~7.51，呈弱酸性到弱碱性之间，只在该类群中出现的代谢物有 L-赖氨酸、十九烷、二十八烷、2-吡咯烷酮羧酸、琥珀酸、十四酸、尿素、肌醇。类群 为初始 pH 为 9、11 的代谢物，其特点为：发酵终点 pH 值为 7.83~8.21，且含有正十四烷、二十二烷、亚硫酸、乙胺，而其他类群中没有。综上所述，初步推断酸碱度相近的发酵液

中成分相对接近，而发酵液的 pH 在一定程度上影响了其代谢物的种类和含量。

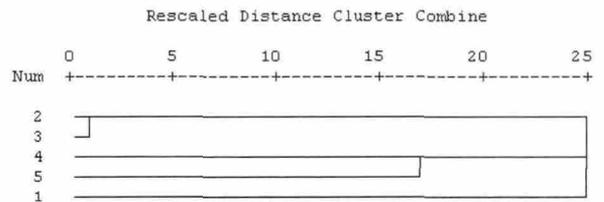


图 3 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 不同代谢物产生的初始 pH 条件的聚类分析

2.5 不同初始 pH 条件下枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物的主成分分析

以各样品代谢标志物及相对丰度为指标，构建数据矩阵，并进行主成分分析。以不同的初始 pH 为变量，进行主成分分析，结果见图 4。结果表明，初始 pH 值为 5 和 7 的样品聚为一类；初始 pH 值为 9 和 11 的样品聚为一类；而 pH 为 3 的样品单

独聚为一类。说明初始 pH3 的样品中代谢物种类或含量与其他样品差别较大, 仅在 pH3 样品中被检测到的代谢物有 L-色氨酸、丁烷、十三烷、二十烷。

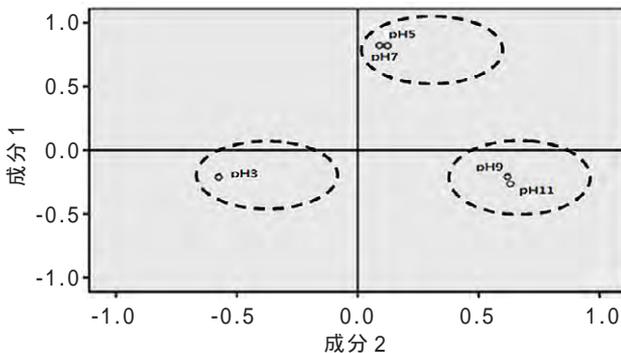


图4 以不同初始 pH 为变量的主成分分析

3 讨论与结论

从枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 胞内代谢物中分离到高匹配率物质 32 种, 包括氨基酸、烷烃类、有机酸等, 这些物质在微生物生命活动中扮演着重要作用, 以下对这几类物质的活性分别进行阐述。(1)氨基酸类: 色氨酸在医药、食品和饲料添加剂方面具有广泛的用途, 郑蕾等^[12]研究了谷氨酸棒状杆菌发酵色氨酸的工艺; 丙氨酸是血液中氮的有效运输工具, 还是一种重要的生糖氨基酸; 异亮氨酸作为一种重要的氨基酸, 白郁山等^[13]研究了异亮氨酸在微生物抗酸逆境中的作用; 酪氨酸作为一种重要的合成前体, 其生物合成得到深入研究^[14]; 赵凯等^[15]通过对赖氨酸合成菌株筛选得到高产菌株, 对赖氨酸的应用具有促进意义。(2)有机酸类: 棕榈酸和硬脂酸是生物界常见的有机酸类, 一般在工业中用于物质的合成。亚硫酸因其还原性而具有一些特殊的生物活性^[16]。丁二酸不仅是 TCA 循环中的重要物质, 还是很多工业合成的原料。(3)其他物质: 尿素在生物体氮代谢中扮演着重要作用, 是生物体内具有重要生理作用的一类化合物。对这些高匹配物质的深入分析对于分析代谢物与芽胞杆菌抗逆之间关系具有积极意义。

枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 的代谢物种类和含量与其培养环境的酸碱度变化呈一定的相关性。分析该菌胞内代谢物的聚类结果, 发现较强酸性(pH=3)条件下培养的胞内代谢物具有特异性; 而接近中性

(pH=5、7)条件下培养胞内代谢物则相似, 碱性(pH=9、11)条件下培养的胞内代谢物相似。芽胞杆菌代谢物与生长环境之间存在明显的相关性, 当生长环境发生改变后, 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 会及时对代谢物做出相应调整, 以适应环境的变化。枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 发酵终点 pH 朝着中性或弱碱性(pH=7.5)靠近。这是生物体与环境之间相互作用的结果, 是生物体对不断变化的复杂环境的适应。初步判断, 枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 代谢物质随培养酸碱度的变化而做出复杂的变化, 并不只是单纯的线性关系。

在枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 的高含量代谢物中, 二十七烷在 pH 11 时含量最高, 酪氨酸在 pH 3 时含量最高。二十七烷对于菌株应对碱性环境可能具有作用, 酪氨酸除作为蛋白合成必需氨基酸外, 在菌株适应酸性环境中也可能发挥作用。在中性和弱酸性条件下 FJAT 具有更多的物质种类和更高的物质含量, 初步推测在中性和弱酸性环境中菌株具有较高的代谢活力, 激活代谢通路多具有更复杂的代谢网络。

此外, 发酵液中与质谱谱库无匹配或者匹配率较低的成分有很多, 说明该微生物主要的次生代谢成分有待深入研究。随着未知成分的深入研究, 将有助于进一步揭示枯草芽胞杆菌 FJAT-14254 的抗逆机制。

参考文献

- [1] 余小霞, 田健, 伍宁丰. 枯草芽胞杆菌芽胞表面展示外源蛋白的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 31-38.
- [2] 廉新慧, 李金敏, 谷巍. 益生菌和两种多糖合用对海兰褐蛋鸡免疫功能影响的研究[J]. 家畜生态学报, 2012, 33(4): 73-77.
- [3] 邱思鑫, 范晓静, 洪鹏翔, 等. 苏云金芽胞杆菌营养期杀虫蛋白基因 *vip3A* 在枯草芽胞杆菌中的表达[J]. 昆虫学报, 2010, 53(5): 508-516.
- [4] 王启军. 枯草芽胞杆菌 B6-1 产脂肽和聚- γ -谷氨酸及抗几种植物病原菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [5] 彭霞. 枯草芽胞杆菌在养猪生产上的应用[J]. 广东饲料, 2010, 19(2): 26-27.
- [6] 赵秀香, 吴元华. 枯草芽胞杆菌 SN-02 代谢物的抗病毒

- 活性、表面活性剂特性及其化学成分分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 124-128.
- [7] 董伟欣, 李宝庆, 李社增, 等. 脂肽类抗生素 fengycin 在枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株抑制番茄灰霉病菌中的功能分析[J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 401-410.
- [8] 王启军, 陈守文, 喻子牛. 枯草芽胞杆菌 B6-1 产拮抗物质性质的研究[J]. 孝感学院学报, 2008, 28(3): 82-84.
- [9] 林宝英, 谭志琼, 张容意. 枯草芽胞杆菌 B25 抗菌物质初步研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(1): 82-84.
- [10] 孔 建, 王文夕. 枯草芽胞杆菌 B-903 菌株的研究[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 65-68.
- [11] 蔡全信, 刘娥英. 温度和 pH 对 B. s. C3-41 菌株生长和毒力的影响[J]. 微生物学杂志, 1995, 15(2): 22-24.
- [12] 郑 蕾, 周守标. 谷氨酸棒状菌发酵色氨酸的工艺研究[J]. 芜湖职业技术学院学报, 2010, 12(3): 45-47.
- [13] 白郁山, 刘 政, 张 丹, 等. 异亮氨酸对嗜酸氧化亚铁硫杆菌胞外多聚物的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2014(1): 118-120.
- [14] 姚元锋, 赵广荣. L-酪氨酸代谢工程研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 132-137.
- [15] 赵 凯, 段 巍, 孙立新, 等. 用基因组重排技术选育赖氨酸高产菌株[J]. 微生物学报, 2009, 49(8): 1 075-1 080.
- [16] 靳玲侠. 亚硫酸氢根诱导胞嘧啶及其衍生物水解去氨基机理的理论分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.

(上接第 34 页)

以处理 4 纯氮(N)用量为 225 kg/hm² 的上海青生物量最高为 245 926.95 kg/hm²。

(2) 上海青体内硝态氮含量都低于国家蔬菜熟食标准, 符合国家蔬菜安全生产要求, 随纯氮(N)用量的增加上海青体内硝态氮积累也增加, 以处理 4 纯氮(N)用量为 225 kg/hm² 的硝态氮含量较高为 748.13 mg/kg。

(3) 不同氮肥处理所吸收氮的量都比空白高, 对氮肥利用率最高是处理 5, 纯氮(N)用量为 75 kg/hm² 为 46.42%; 最低的是处理 7 纯氮(N)用量为 225 kg/hm² 为 18.01%, 各处理间氮肥的利用率均有明显差异。

(4) 在当地土壤条件下, 施用普通尿素情况下, 施用量为 489.15 kg/hm² 产量相对较高; 施用缓效氮肥情况下, 施用量为 197.25 kg/hm² 产量相对较高。在普通尿素和缓效氮肥对比之下, 纯氮(N)用量为 75 kg/hm² 的处理 5, 即缓效氮肥施用量为 197.25kg/hm² 时效果较好。

参考文献

- [1] Yang X E, Sun X. A kinetic study on NH₄⁺ and NO₃⁻ uptake by various rice varieties [J]. Chinese Journal of Soil Science, 1991, 22(5): 222-224.
- [2] 王朝辉, 李生秀, 田霄鸿. 不同氮肥用量对蔬菜硝态氮累积的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 1998, 4(1): 22-28.
- [3] 罗 涛, 王煌平, 何 盈, 等. 两种氮肥不同用量及添加双氰胺对蔬菜品质和土壤氮形态的影响[J]. 土壤通报, 2010, 41(2): 21-24.
- [4] 陈 清, 张宏彦, 张晓晟, 等. 京郊大白菜的氮素吸收特点及氮肥推荐[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(4): 404-408.
- [5] 中华人民共和国农业部. 蔬菜、水果中硝态氮的测定紫外分光光度法. NY/T 1279-2007: 11-15.
- [6] 沈明珠. 蔬菜硝态氮累积的研究[J]. 园艺学报, 1982, 9(4): 41-48.
- [7] 高祖明. 氮磷钾对叶菜硝态氮积累和硝酸还原酶、过氧化物酶活性的影响[J]. 园艺学报, 1982, 16(4): 193-298.
- [8] 韩德昌, 陈 妍, 关连珠, 等. 氮肥种类及用量对油菜硝酸盐累积的影响. 中国农学通报, 2005, 21(5): 65-67.